HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	膵癌におけるシグナル伝達アダプター分子CRKの役割の解析
Author(s)	植村, 慧子
Description	配架番号：2573
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14170号
Issue Date	2020-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14170
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78901
Type	doctoral thesis
File Information	Satoko_Uemura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

膵癌におけるシグナル伝達アダプター分子
CRK の役割の解析

（Analysis of role for signaling adaptor protein
CRK in pancreatic cancer）

2020 年 6 月

北 海 道 大 学

植 村　慧 子

学　位　論　文

膵癌におけるシグナル伝達アダプター分子
CRK の役割の解析

（Analysis of role for signaling adaptor protein
CRK in pancreatic cancer）

2020 年 6 月

北 海 道 大 学

植 村　慧 子

目 次

発表論文目録および学会発表目録 ……1 頁
要旨 ……2 頁
略語表……5 頁
緒言……6 頁
方法 ……11 頁
結果 ……17 頁
考察 ……34 頁
結論……38 頁
謝辞 ……39 頁
利益相反 ……40 頁
引用文献 ……41 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Satoko Uemura, Lei Wang, Masumi Tsuda, Jun Suzuka, Satoshi Tanikawa, Hirokazu Sugino, Toru Nakamura, Tomoko Mitsuhashi, Satoshi Hirano, Shinya Tanaka.
Signaling adaptor protein Crk is involved in malignant feature of pancreatic cancer associated with phosphorylation of c-Met.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 524(2):378-384, pii: S0006-291X(20)30180-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.105

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 植村慧子、王磊、津田真寿美、田中伸哉
膵癌におけるシグナル伝達アダプター分子 Crk の役割の解析
第 108 回日本病理学会総会, 2019.5.9-11, 東京

2. Satoko Uemura, Lei Wang, Masumi Tsuda, Satoshi Hirano, Shinya Tanaka
Role for signaling adaptor protein Crk in pancreatic cancer
The 38th Sapporo International Cancer Symposium, 2019.7.11-13, Sapporo

3. 植村慧子、王磊、津田真寿美、平野聡、田中伸哉
膵癌におけるシグナル伝達アダプター分子 Crk の役割
第 120 回日本外科学会定期学術集会, 2020.4.16-18 が延期となり 2020.8.13-15 に開催予定, 横浜

要旨

【背景と目的】

近年、様々な癌種で薬物治療の発展に伴い生存率の向上が認められているが、膵癌は依然として極めて予後不良な疾患である。膵癌治療における唯一の根治治療は外科的切除であるが、膵癌の早期診断は困難であり、外科的切除の対象となる患者は 30%程度に過ぎない。また膵癌に対して、ゲムシタビンを始め様々な薬剤や併用療法が登場し今日に至るが、十分な予後改善効果を得るには至っていない。膵癌は KRAS 変異を高頻度に認め、RAS の恒常的な活性化により下流のシグナル経路が活性化されているため、上流のチロシンキナーゼに対する阻害剤の効果に乏しい。このような現状を踏まえ、分子標的治療による新たなアプローチが期待されている。本研究では、RAS に依存しないシグナル伝達経路として、アダプター分子 Crk（CT10-regulated kinase）に着目した。

Crk はニワトリの肉腫誘導レトロウイルス CT10 がコードする癌遺伝子産物から分離された癌遺伝子であり、チロシンキナーゼ Src の酵素活性調節領域である SH2、SH3 を有し、SH2-SH3 からなる Crk-Ⅰ、SH2-nSH3-cSH3 からなる Crk-Ⅱ、Crk-Ⅱと同様の SH 領域から成る Crk-L が Crk のアイソフォームとして知られている。Crk はチロシンキナーゼとグアニンヌクレオチド交換因子である C3G や Dock180 を連結し、低分子量 G 蛋白質である Rap、Rac、Ras を活性化する。北海道大学腫瘍病理学教室での先行研究において、Crk は細胞の増殖、運動、接着を制御し、滑膜肉腫、膠芽腫、肺癌、膀胱癌等において癌の浸潤・転移に寄与することが判明しているが、膵癌と Crk との関連は未だ不明である。本研究では、膵癌における Crk の役割を解明し、新たな治療標的となり得るか検討することを目的とした。

【材料と方法】

ヒト膵癌手術検体 51 症例を用いて Crk の免疫組織化学染色を行い、染色強度と生命予後との関連を評価した。次に、膵癌の 95%で検出される KRAS 変異を有する 4 種類のヒト膵癌細胞株（PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2、Capan-2）を用いて、以下の検討を行った。１）Crk および関連蛋白質の発現量、また Crk の上流および下流分子や関連シグナル伝達経路のリン酸化状態をウエスタンブロッティング法により検討した。２）免疫沈降法により、Crk と下流分子である Dock180 および C3G との結合比率を解析した。３）shRNA を用いて Crk 安定ノックダウン細胞株の樹立を試みた。Crk と Crk-

L の各ノックダウン細胞、およびそれぞれのコントロール細胞を樹立するため、腫瘍病理学教室でこれまで使用実績のある 4 つの shRNA 生成用プラスミドを使用した（pSuper-empty, pSper-Crki, pLenti6.4-Nega, pLenti-Crk-Li(1205)）。ピューロマイシン耐性細胞株を樹立し、Western blotting において Crk の発現量を解析した。４）樹立した Crk ノックダウン細胞株を用いて、足場依存的および非依存的増殖能、運動能、接着能をコントロール細胞と比較検討した。５）*In vivo* 実験として、5×10^5 個の PANC-1 細胞（コントロールおよび Crk ノックダウン細胞）を 6 週齢の雌ヌードマウスの膵臓に被膜下注射して同所性異種移植モデルマウスを作製し、マウスの生存率を比較検討した。６）形成された腫瘍において、壊死領域および MIB-1 インデックスを計測し、コントロールおよび Crk ノックダウン細胞間での差異を解析した。

【結果】

ヒト膵癌切除検体を用いた Crk の免疫組織化学染色では発現レベルに差異が認められ、Crk 高発現群の患者は低発現群と比較して有意に予後不良であった。

4 種類の膵癌細胞株について Crk および Crk 関連分子の発現量をウエスタンブロッティング法で解析したところ、Crk、Crk-L、$p130^{Cas}$、パキシリン、Dock180 は細胞株間で有意な差は検出されず、C3G は PANC-1 および MIA PaCa-2 細胞で発現量の増加を認めた。免疫沈降法による解析では、Dock180 は Crk と Crk-L の両方に結合したが、C3G は Crk よりも Crk-L に対して高い結合能力を示した。Crk に対する shRNA を使用して Crk-I および Crk-II 共に発現量が効果的に減少した PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2 細胞を樹立した。形態的には、Crk ノックダウン細胞は、コントロール細胞と比較して伸展度が低く、円形に近い形態を示した。Crk ノックダウン細胞は、コントロール細胞と比較して増殖能が低下し、特に AsPC-1 および MIA PaCa-2 細胞でその抑制効果は顕著であった（足場依存性増殖）。またコロニー形成アッセイでは、Crk をノックダウンした PANC-1 および AsPC-1 細胞では大型コロニーの数が減少し、足場非依存性増殖能の低下を示した。創傷治癒アッセイにより、PANC-1 細胞で Crk ノックダウンにより細胞運動性が有意に低下した。接着アッセイにおいて、フィブロネクチンへの接着は Crk ノックダウン PANC-1 細胞で減少し、AsPC-1 細胞ではコラーゲンへの接着が減少した。また血清刺激条件下での c-Met のリン酸化は、PANC-

1 および AsPC-1 細胞において Crk ノックダウンにより抑制される傾向が認められた。

In vivo 同所性異種移植モデルマウスでは、コントロール群と Crk ノックダウン群の両者で膵臓に腫瘍が形成されたが、壊死領域と MIB-1 インデックスは共に、Crk ノックダウン群で有意に減少した。さらに、Crk ノックダウン群ではマウスの生存時間が有意に延長した。

【考察】

本研究により、ヒト膵癌組織における Crk 発現量が患者予後と関連していたことから、Crk の免疫染色強度の評価は膵癌患者の予後予測の一助となる可能性が示唆された。樹立した Crk ノックダウン膵癌細胞において c-Met のリン酸化が減少し、同時に細胞の増殖能、運動能、接着能の低下を認めた。また *in vivo* マウス実験において、Crk ノックダウン細胞によって形成された腫瘍では、急速な細胞増殖の結果生じる壊死領域の減少と細胞の増殖能力を示す MIB-1 インデックスの低下が認められ、コントロール群に比較してマウスの生存期間の延長が示された。

膵癌では KRAS 変異が高頻度に検出されるため、シグナル伝達経路の上流に位置する EGFR や VEGFR などのチロシンキナーゼ阻害剤は、基本的には効果が認められない一方で、本研究により、チロシンキナーゼ下流の Crk は膵癌において次の治療標的となり得ることが示唆された。HGF/c-Met シグナルの活性化は細胞の浸潤・増殖を促進し腫瘍形成に寄与していると報告されており、HGF/c-Met/Crk シグナル経路において Crk が c-Met 蛋白質の安定化に関与していることや Crk が HGF の転写を制御している可能性も示唆される。現在、膵癌の分子標的治療においては、エルロチニブが唯一ゲムシタビンとの併用で標準治療の適応となっているが、その効果は十分ではなく、新たな分子標的治療薬が切望されている。このような現状において、Crk および HGF/c-Met/Crk シグナル経路に着目した新規治療法の確立が期待される。

【結論】

ヒト膵癌組織における Crk 発現量と予後との関連、Crk ノックダウン膵癌細胞における c-Met のリン酸化低下に関連した細胞の増殖能、運動能、接着能の低下と *in vivo* 同所異種移植モデルマウスにおける検討により、Crk とその関連蛋白質は膵癌治療において抗腫瘍効果が期待できる新たな分子標的となることが期待された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

C3G	CRK SH3 domain binding GEF
c-Met	c-mesenchymal-epithelial transition factor
Crk	CT10-regulated kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DOCK180	downstream of CRK 180 kDa protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
Gem	Gemcitabine
Hh	hedgehog
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAP2K	MAP kinase kinase
MTT	methylthiazolyl tetrazolium
mTOR	mammalian target of rapamycin
PBS	phosphate-buffered saline
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PI3K	phosphatidylinositol 3'-kinase
PTCH	patched
RPMI	Roswell Park Memorial Institute media
RTK	receptor tyrosine kinase
shRNA	small hairpin RNA
SH	Src homology
SMO	smoothened
SUFU	suppressor of fused
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

【緒言】

膵癌の疫学と治療の現状

浸潤性膵管癌（Pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC）は膵癌の大部分を占めており、ヒトの腫瘍の中で最も悪性度が高く、予後不良の癌として知られている。日本では Stage Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳの膵癌の 5 年生存率はそれぞれ 41%、18%、6%、1.4%であり、全体でも 9%程度となっている。また 2018 年に公表された癌の 3 年生存率の部位別統計でも膵癌が 15.1%と最も低いことが明らかとなった。日本では 2017 年の統計で部位別癌死亡者数において男性 5 位、女性 3 位、全体で 4 位であり、年間 3 万 4 千人が膵癌により死亡している（国立がん研究センターがん情報サービス, 2019）。またアメリカでは膵癌患者数は 2010 年の 4 万 3 千人から 2030 年には 8 万 8 千人へ上昇、死亡数も 3 万 6 千人から 6 万 3 千人へ上昇し、部位別癌死亡数で現在の第 4 位から肺癌に次ぐ第 2 位になると予測されている（Rahib et al., 2014）。

現在、膵癌の唯一の根治治療は外科的切除である。しかし膵臓は胃の背面に位置しており、発生初期では症状を示さず、診断時には既に遠隔転移または血管浸潤をきたしており外科的治療が困難なことが多い（Warshaw et al., 1992）。切除不能膵癌に対して、あるいは術前術後再発予防目的の化学療法がこれまでに様々な臨床試験を経て承認されている。Gemcitabine（Gem）単剤は 2001 年に PDAC 治療の標準治療となったが、S-1 単剤、Erlotinib + Gem、FOLFIRINOX（5-FU, leucovorin, irinotecan, oxaliplatin）、nab-Paclitaxel + Gem が続いて承認された（Conroy et al., 2011; Moore et al., 2007; Von Hoff et al., 2013）。近年、分子標的治療薬が様々な癌の治療に導入されており、PDAC に対しても各種臨床試験が実施されてきたが、Erlotinib + Gem でわずかな併用効果が示されたのみであった（Sheahan et al., 2018）。これらの化学療法における予後改善効果は未だ不十分であり、Gem との併用による新しい分子標的治療薬が切望されている。

膵癌のシグナル伝達経路

膵癌の治療標的分子の探索において注目されているシグナル伝達経路には、RAS–mitogen activated protein kinase（MAPK）、phosphatidylinositol 3'-kinase（PI3K）–AKT–mammalian target of rapamycin（mTOR）、hedgehog（Hh）の 3 経路がある（図 1）。RAS-MAPK 経路は、細胞膜に局在する上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor, EGFR）や

血管内皮成長因子受容体（vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR）にそれぞれの増殖因子が結合することにより活性化される。多くの癌でこれらの受容体が過剰発現しているためその阻害剤が治療に使用されているが、膵癌では KRAS 変異を 95%以上に認め RAS が恒常的に活性化されているため、KRAS 上流のチロシンキナーゼを標的としたほとんどの分子標的薬は無効である（Furukawa, 2008）。一方、PI3K–AKT–mTOR 経路も膵癌において活性化が認められる。PI3K は増殖因子受容体からシグナルを受けて AKT を活性化し、その結果セリン・スレオニンキナーゼの mTOR が活性化される。mTOR は細胞増殖を促進しアポトーシスを抑制する。さらに、膵癌では Sonic Hedgehog （Shh）の異常発現により Hedgehog （Hh）経路も活性化されており、標的遺伝子の転写を亢進する。これまでこれらの経路上に存在する分子に対する阻害剤が開発され、多数の臨床試験が施行されてきたが、いずれも第Ⅲ相試験で効果が証明されたものはなく臨床応用には至っていない。

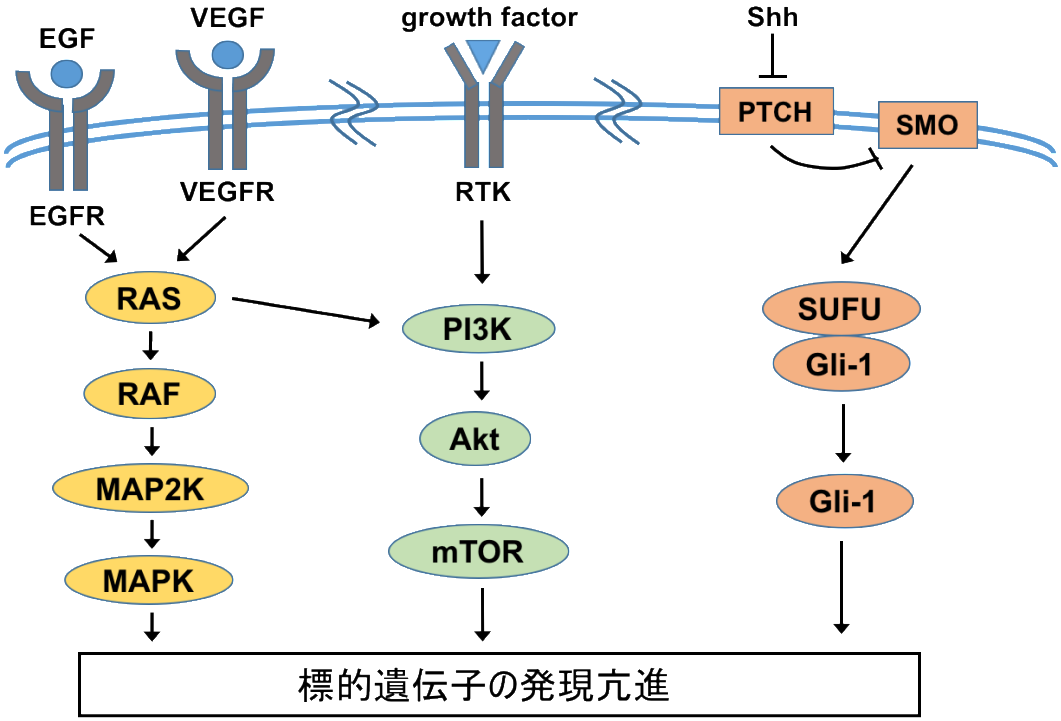


図 1　膵癌における主要シグナル伝達経路の概略図
（島崎ら、2010）より改変
RAS–MAPK、PI3K–AKT–mTOR、hedgehog の 3 経路を示す。
MAP2K, MAP kinase kinase; PTCH, patched; RTK, receptor tyrosine kinase; Shh, sonic Hh; SMO, smoothened; SUFU, suppressor of fused.

そこで RAS 以外の低分子量 G 蛋白質の活性化に関与し、様々なチロシンキナーゼの下流に存在しているシグナル伝達アダプター分子 Crk に注目した。

Crk の構造・機能と癌との関連

Crk は、ニワトリの肉腫誘導レトロウイルスがコードする癌遺伝子産物 viral-Crk から分離された癌遺伝子であり、チロシンキナーゼと低分子量 G タンパク質活性化因子（グアニンヌクレオチド交換因子）をリンクするアダプター分子であるが、自身は酵素活性をもたない（Mayer et al., 1988）。Crk はチロシンキナーゼ Src の酵素活性調性領域である Src homology domain（SH）2、SH3 を有し、SH2-SH3 からなる Crk-I（28 kDa）、SH2-nSH3-cSH3 からなる Crk-II（40 kDa）、Crk-Ⅱと遺伝子座は異なるものの Crk-Ⅱと同一の SH 領域からなる Crk-L が Crk の相同体として知られている（図 2。 Matsuda et al., 1992; Hoeve et al., 1993）。

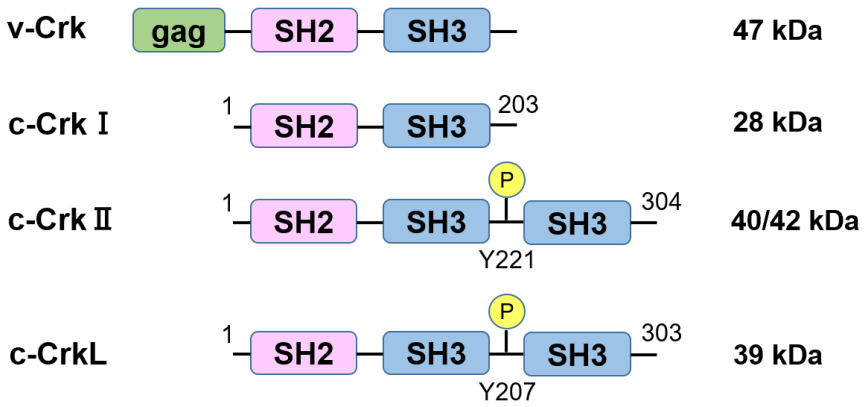


図 2　Crk の構造の概略
（Matsuda et al., 1992; 田中、2009; Cabodi et al., 2010）より改変
Crk-I は SH2-SH3 からなる。Crk-Ⅱは SH2-nSH3-cSH3 からなり、２つの SH3 領域の間にチロシン残基 Y221 が存在する。Y221 は Abl などのチロシンキナーゼによってリン酸化されると自身の SH2 領域と結合し、その結果シグナルはシャットオフされる。Crk-L は Crk-Ⅱと同一の SH 領域からなりチロシン残基 Y207 が存在する。

Crk はチロシンリン酸化を受けた増殖因子受容体や細胞接着斑の構成分子 p130^{Cas} や paxillin と SH2 を介して結合する。また Crk の nSH3 と結合した C3G（CRK SH3 domain binding GEF）や DOCK180 （downstream

of CRK 180 kDa protein）などのグアニンヌクレオチド交換因子が細胞膜近傍に局在することで、低分子量 G 蛋白質である Rac、Ras、Rap が活性化される（Feller et al., 2006; Bos et al., 2007）。Small hairpin RNA（shRNA）による Crk の恒常的な発現抑制実験から、これらの Crk 関連シグナル経路は細胞の増殖、運動、接着、浸潤能など、多様な生命現象を制御していることが明らかとなっている（図 3）。

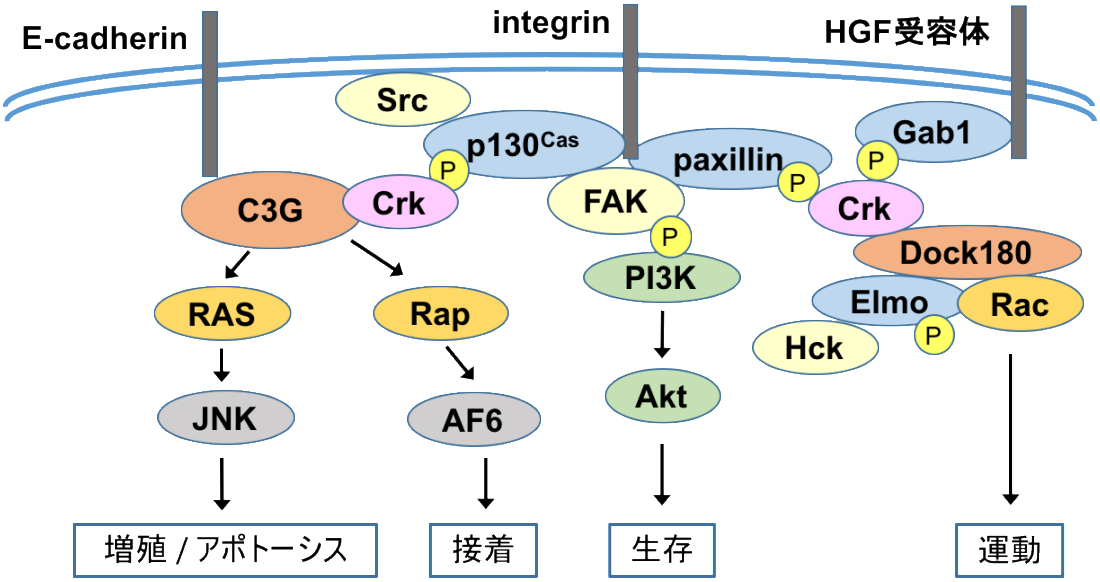


図 3　Crk によるシグナル伝達制御メカニズムの概要
（Brown et al., 2004; 田中、2009; Cabodi et al., 2010; Gherardi et al., 2012）より改変

Crk の過剰発現は様々なヒト癌で検出され、最近では卵巣癌、滑膜肉腫、膠芽腫、乳癌、肺癌、膀胱癌などにおいて、癌の浸潤・転移と関連し悪性度を制御する分子であることが判明している（Linghu et al., 2006; Wang et al., 2007; Watanabe et al., 2009a; Fathers et al., 2012; Matsumoto et al., 2015; Elmansuri et al., 2016）。一方、膵癌の悪性化における Crk の役割は未だ不明な点が多い。図 4 に、膵癌の代表的なシグナル伝達経路と、これまでに明らかになっている Crk および関連分子の関与を示す。

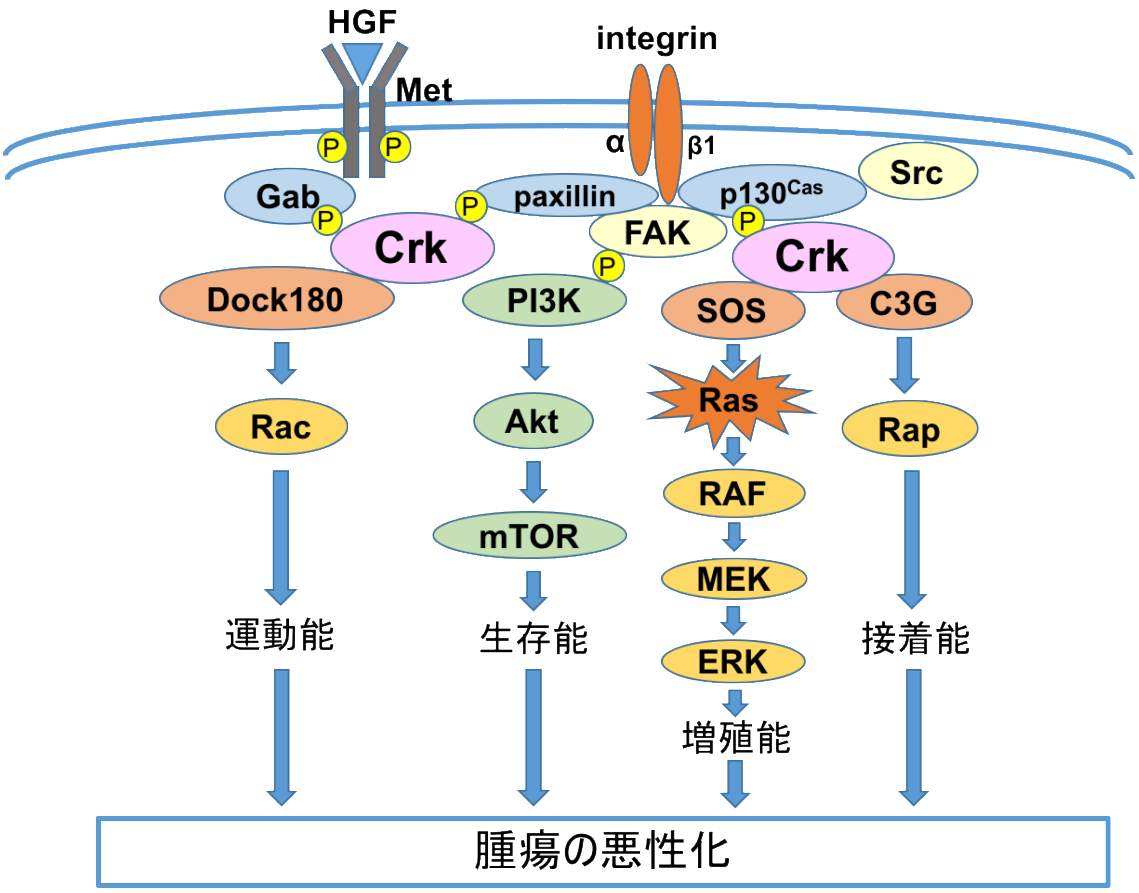


図 4　膵癌における Crk を介するシグナル伝達経路

Crk が介在するシグナル伝達経路は RAS 経路と独立して複数存在し、細胞増殖以外で運動能や接着能を阻害することで膵癌の悪性度を低下させることができれば、Crk が膵癌において新たな治療標的になり得ると推測し、本研究においてそれを検証することとした。最初に、ヒト PDAC 組織における Crk 発現量と生命予後との関係を検討した。次に Crk ノックダウンヒト膵癌細胞株を樹立し、*in vitro* 環境での細胞増殖、浸潤、接着能を評価した。さらに、膵癌の同所性異種移植マウスモデルを作製し、Crk ノックダウンがマウスの生存率に及ぼす影響を検討した。

【方法】

1）細胞株

ヒト PDAC 細胞株（PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2、Capan-2） は、American Type Culture Collection から入手した。PANC-1 および MIA PaCa-2 は Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）培養液、AsPC-1 および Capan-2 は Roswell Park Memorial Institute media（RPMI-1640）培養液を用い、5%二酸化炭素（CO_2） 存在下、37 度のインキュベータ内で培養した。各培養液には 10%ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 U/ml ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した。

2）ウエスタンブロッティング法

細胞に radioimmunoprecipitation assay（RIPA）バッファー [10 mM Tris-HCl （pH 7.4)、5 mM EDTA、150 mM NaCl、10% glycerol、1% Triton X-100、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS、50 mM NaF、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride（PMSF)、1 mM sodium orthovanadate（Na_3VO_4)、protease inhibitor mixture: Complete（EDTA-free） protease inhibitor（Roche、Basel、Switzerland）] を添加し、氷上にて 20 分間静置後、4℃にて 15,000 rpm、10 分間遠心し上清を回収した。回収した上清に 2×還元サンプルバッファー（2×Laemmli sample buffer） を添加し、95℃にて 5 分間熱変性させ、イムノブロッティング法のサンプルとして用いた。10% SDS 含有アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を実施後、分離された蛋白質を PVDF メンブレン（Millipore、Billerica、MA、USA）に転写した。転写後のメンブレンは TBS-T で希釈した 2% BSA もしくは 5%スキムミルク溶液を用いてブロッキング後、一次抗体を 4℃で一晩反応させた。反応後のメンブレンは TBS-T で洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、再度 TBS-T で洗浄後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare、Little Chalfont、UK) による処理後、LAS 4000 mini（GE Healthcare）を用いてシグナルを検出した。

一次抗体は以下の抗体を用いた。

抗 CrkL（C20）抗体、抗 C3G（C19）抗体、抗 DOCK180（H4）抗体、抗 EGFR 抗体、抗 ERK（C16）抗体（Santa Cruz, CA, USA より購入)。抗 paxillin 抗体、抗 $p130^{Cas}$ 抗体、抗 Crk 抗体 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA より購入)。抗 phospho-EGFR（Y1068）抗体、抗 c-Met 抗体、抗 phospho-c-Met (Y1234/1235) 抗体、抗 FAK 抗体、抗 phospho-

FAK（Y397）抗体、抗 phospho-ERK1/21 抗体、抗 Akt 抗体、抗 phospho-Akt 抗体、抗 p38 MAPK 抗体、抗 phospho-p38 MAPK（Y188）抗体（Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA より購入）。抗 actin（C4）抗体（Millipore, Billerica, MA, USA より購入）。

3) 免疫沈降法

培養細胞を PBS で洗浄後、細胞溶解液[0.5% NP-40、10 mM Tris-HCl（pH 7.4）、150 mM NaCl、1 mM EDTA、50 mM NaF、1 mM PMFS、1 mM Na_3VO_4]を用いてタンパク質を抽出した。2 μg の抗体（抗 Crk 抗体、抗 CrkL 抗体）と 1.2 mg のタンパク質を含む細胞抽出液を混合し、4℃で１時間回転させた。さらに 15 μl のプロテイン G あるいは A セファロースビーズ（GE Healthcare Life Sciences, Tokyo, Japan）を加え、4℃で 1 時間回転させた。沈降タンパクは遠心して分離し、上記溶解緩衝液で 3 回洗浄し、上清を除去した後 10 μl の 2×SDS サンプルバッファーに溶解した。調整したサンプルに対し抗 DOCK180 抗体、抗 C3G 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

4) Crk knockdown 膵癌細胞株の樹立

FuGENE HD transfection reagent（Roche Applied Science, Mannheim, Germany）を用いて、1.5 μg pSUPER-Crki と 0.3 μg pBabe-puro の plasmid を同時に膵癌細胞に遺伝子導入し、2 μg/ml puromycin を含む培養液で 2 - 3 週間培養し、生存コロニーを単離した。コントロールとして 1.5 μg pSUPER-empty を用いて同様にコロニーを単離した。Crk の発現量はウエスタンブロッティング法にて解析した。

5) 細胞増殖能の測定（足場依存性増殖能）

直径 60 mm の培養ディッシュ上に各細胞株を 1×10^5 個播種し、1 % FBS 含有 DMEM または RPMI-1640 で 37℃、5% CO_2 環境下にて培養し、血球計算盤（Fisher Scientific, USA）を用いて 1、3、5 日目に細胞数を計測した。

6) Wound healing assay（細胞運動能の測定）

直径 60 mm の培養ディッシュ上で 100% confluent となった細胞に対し、ブルーチップを用いて一直線の傷を付与した。PBS で洗浄後、新しい培養液に交換し 37°C、5% CO_2 環境下で培養し 0、4、8、24 時間後の細胞の移

動距離を測定した。測定は、サンプル毎に 3 視野を無作為に選択し、傷の回復率の平均値および標準偏差を算出した。

7) Colony formation assay（足場非依存性増殖の測定）

直径 60 mm の培養ディッシュに予め 0.5% bacto agar 5 ml を固化後、1×10^5 個の細胞を 0.4% noble agar 3 ml に懸濁して固化した bacto agar の上に添加した。冷却後培地が固化したことを確認後、37°C、5% CO_2 条件下で 1 週間（PANC-1）または 2 週間（AsPC-1）培養し、ディッシュ上のコロニー数（PANC-1： 直径 250-500 μm、500 μm-1 mm、1 mm 以上、AsPC-1： 直径 50-100 μm、100-200 μm、直径 200 μm 以上）を顕微鏡下で測定した。

8) Adhesion assay（細胞外基質への接着性の測定）

4×10^4 個の細胞を 0.1 ml の DMEM または RPMI-1640 培養液に懸濁し、無処理、あるいはコラーゲンまたはフィブロネクチンでコーティングした 96 ウェルプレート上に播種した。5、10、20 分間インキュベーションの後、各ウェルに接着した細胞を 0.04%クリスタルバイオレットで染色、dimethyl sulfoxide（DMSO）で溶解後に OD A590 nm の分光光度計で定量した。

9) 接着斑キナーゼ（focal adhesion kinase, FAK）阻害剤添加実験

直径 35 mm の培養ディッシュに PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2 細胞を 1×10^5 個ずつを播種したものを各 6 枚作製した。翌日、FAK 阻害剤である PF 573228 を 0、2.5、5、10、20、40 μM になるように培養液に添加した。48 時間後に細胞を回収し、FAK の発現量とリン酸化量をウエスタンブロッティング法により解析した。

10) 血清刺激実験

直径 35 mm の培養ディッシュに 1×10^5 個の細胞を播種したものを 4 枚作製した。約 80% confluent になった時点で培養液を Opti-MEM（Gibco）に置換し、更に一晩培養した（血清飢餓状態）。翌日、10% FBS 含有 DMEM にメディウム置換後（血清刺激）、0、10、20、30 分で細胞を回収し、増殖関連タンパク質（c-mesenchymal-epithelial transition factor（c-Met）、EGFR、FAK、Akt、p38 MAPK、extracellular signal-regulated kinase

（ERK)） のリン酸化の程度をウエスタンブロッティング法により解析した。

11) c-Met 阻害剤(SU11274)添加時の methylthiazolyl tetrazolium(MTT) assay

96 well プレートに 1×10^4 個/well のコントロール細胞および Crk ノックダウン細胞を 8×6 列ずつ播種した。翌日、細胞が接着していることを確認後、c-Met 阻害剤 SU11274 を 0、1.25、2.5、5、10、20 μM の濃度になるように添加した（各濃度につき 8 well ずつ準備。)。24 時間後に SU11274 を同濃度で再度処理し、最初の添加から 48 時間後に以下の手順で MTT assay（Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA）を行った。各ウェルに 20 μL の MTT 溶液を加え、5% CO_2 環境下で 3.5 時間培養した。培地を取り除いた後、MTT 溶出液を各ウェルに 150 μL 加え、プレートをアルミホイルで遮光しシェーカーで 30 分間攪拌した。その後、マイクロプレートリーダーを用いて 590 nm の吸光度を測定した。なお、SU11274 は c-Met の特異的阻害剤であり、HGF 依存的な細胞増殖を IC50 値である 1～1.5 μM で阻害する。c-Met を高発現している膵癌細胞においては、10～30 μM の高濃度においても選択性を有すると考えられる（Tomizawa et al., 2015; Wiest et al., 2018)。

12) c-Met 阻害剤（SU11274）添加時の細胞増殖能の解析

直径 60 mm の培養ディッシュに PANC-1 のコントロール細胞と Crk ノックダウン細胞を各 1×10^5 個播種したものを 6 枚ずつ作製し、1% FBS 含有 DMEM で 37℃、5% CO_2 環境下にて培養した。翌日、DMEM または SU11274 (2 μM) を投与し、1 、2 、4 日後に血球計算盤 (Fisher Scientific, USA）を用いて細胞数を計測した。DMEM または SU11274（2 μM）は、24 時間毎にフレッシュなものを添加した。

13) Sphere-forming ability assay

Eagle's medium F-12（300 ml）に、0.4% BSA（10 ml)、insulin（300 μl)、transferin（55 μl)、sodium selenite（387 μl)、 bFGF（60 μl)、EGF（30 μl）を添加し、stem cell medium を作製した。直径 60 mm の PS ディッシュおよび低接着 (Ultra Low) ディッシュに、PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2 細胞の Crk ノックダウン細胞とコントロール細胞を、各 5×10^5 個ずつ播種した。PS ディッシュに撒いた細胞は DMEM で、Ultra Low ディ

ッシュに撒いた細胞は stem cell medium で培養し、14 日後に mRNA を回収した。RNeasy Mini Kit（Qiagen、Valencia、CA、USA）を用いて細胞から total RNA を抽出後、SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit（Invitrogen）を用いて逆転写反応により cDNA を作製した。遺伝子発現解析には Power SYBR® Green Master Mix の調整法に従い、StepOnePlus™ Real-Time PCR System（Applied Biosystems、Foster、CA、USA）を使用して定量 RT-PCR 法を実施した。

14）リン酸化抗体アレイ

PANC-1 のコントロール細胞および Crk ノックダウン細胞を 10%FBS 含有 DMEM で培養した。Human RTK Phosphorylation Antibody Array I キット（RayBio®）を使用し、以下の手順で解析を行った。Protease inhibitor cocktail と Phosphatase inhibitor cocktail set Ⅱに 1×Lysis buffer を加え Lysis buffer を作製した。Lysis buffer で上記の細胞を溶解し、氷上にて 30 分静置後、4℃にて 14,000 rpm、10 分間遠心し上清を回収した。蛋白量を 1000 μg に揃えるように 1×Lysis buffer を加えて、計 1.2 ml のサンプル液を作製した。Blocking buffer でブロッキングしたメンブレン 2 枚に各サンプルを全量添加し 4℃で一晩反応させた。Wash buffer Ⅰ/Ⅱにて各 3 回洗浄後、blocking buffer で希釈した biotin-conjugated antibodies を添加し 2 時間室温で反応させた。洗浄後、blocking buffer で希釈した HRP-conjugated streptavidin を添加し、2 時間室温で反応させた。Detection buffer をメンブレンに添加し、LAS 4000 mini（GE Healthcare、Japan）を用いて発光シグナルを検出した。

15) tdTomato-luc2 導入 PDAC 細胞の樹立

発光酵素 Luciferase 2、赤色蛍光蛋白質 tdTomato の共発現ベクター pCSII-CMV-tdTomato-Luc2 を、FuGENE® HD transfection reagent（Promega、Madison、WI、USA）を用いて PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2 細胞（コントロール細胞及び Crk ノックダウン細胞）に遺伝子導入後、0.5 - 0.8 mg/ml ゼオシン（Invitrogen、Carlsbad、CA、USA）にて薬剤選択を実施し耐性コロニーを取得した。遺伝子組換え実験は、北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定を遵守して実施した。

16）ヌードマウスへの同所性移植と評価

生後 6 週齢の雌のヌードマウス Balb/cA Jcl nu/nu（Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan）を 1.75 %イソフルランで全身麻酔後、左季肋下切開を行った。5×10^5 個 の PANC-1 細胞（コントロールおよび Crk ノックダウン細胞、各 n=5）を、皮下切開を介して脾臓直下の膵臓の被膜下に 27G 針を付した 1 mL 使い捨て注射器を使用して緩徐に注入した。マウス各群の全生存期間を評価し、腫瘍の壊死領域と MIB-1 インデックスを測定した。全ての動物実験は、「北海道大学動物実験に関する規定」に従って実施した。

17）ヒト PDAC 手術検体の免疫組織化学染色

ヒト PDAC 組織は、北海道大学消化器外科Ⅱにて外科的切除され、インフォームドコンセントを得た患者標本を用いた。2006 年から 2010 年までに、術前化学療法を行わず手術が先行された計 51 人の患者（68±10 歳：女性 23 名、男性 28 名）で評価した。患者データは消化器外科Ⅱで作成したデータベースおよび行われた予後調査を利用した。ホルマリン固定パラフィン包埋組織は、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色および Crk、MIB-1 の免疫組織化学染色を行った。Crk 染色の強度は HistoQuest software（TissueGnostics, Vienna, Austria）を用いて分析した。血管内皮細胞の染色強度を陽性コントロールとし、膵癌の腺管構造における細胞質の染色強度を数値化した。癌の中心部で代表的な染色強度の部位を数カ所選択し、その強度の平均値を算出した。発現強度のレベルは low（<30）、middle（30-45）、high（45≦）と定義した。3 群の層別化の基準は、染色強度の最大値の二分の一の値である 45 以上の群を high 群（19 人）とし、その同数を middle 群（19 人）、残りを low 群（13 人）とした。

18）統計解析

統計解析には、JMP® version 14（SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA）を用いた。群間比較を行う場合、Student's t-test を用いた。$P< 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

【結果】

1）ヒト PDAC 組織における Crk の発現量と予後との関連

シグナル伝達アダプター分子 Crk は様々な癌腫で過剰発現していることがこれまでに報告されており（Nishihara et al., 2002）、本研究ではまず PDAC 組織における Crk の発現について、ヒト PDAC 手術検体を用いて検討した。免疫組織化学染色では Crk は PDAC 組織の細胞質に弱く染まるものから強く染まるものまで広く観察された（図 5 A）。全生存期間は Crk 発現量が low、middle、high 群の順に延びる傾向にあり、low 群と middle 群、middle 群と high 群では有意差を示さなかったが、low 群と high 群では Crk 高発現群で有意に予後不良という結果であった（P= 0.0348）（図 5 B）。膵癌の外科的切除後の平均生存期間が 18 ヶ月であることから、生存期間を 18 ヶ月未満と 18 ヶ月以上の 2 群に分類すると、Crk 染色強度の中央値はそれぞれ 47.33 と 36.64 であり、有意差は認められないものの Crk 高発現群で予後が悪い傾向が示された（P= 0.0775）（図 5 C）。PDAC 組織は高分化から低分化まで種々の組織像を示したが、組織型の違いによって Crk 染色強度に一定の傾向は認めなかった。表 1 に 51 症例の患者背景を示す。

表 1　51 症例の各群における患者背景因子の内訳

背景因子		Low (n=13)	Middle (n=19)	High (n=19)	P値 L/H	P値 L/M	P値 M/H
Stage-n (%)	Ⅰa/Ⅰb/Ⅱa	6 (46.2)	4 (21.1)	3 (15.8)	0.061	0.132	0.676
	Ⅱb	7 (53.8)	15 (78.9)	16 (84.2)			
R-n (%)	0	11 (84.6)	17 (89.5)	17 (89.5)	0.683	0.683	1
（遺残腫瘍）	1	2 (15.4)	2 (10.5)	2 (10.5)			
術後補助療法-n (%)	あり	6 (46.2)	12 (63.2)	12 (63.2)	0.341	0.341	1
	なし	7 (53.8)	7 (36.8)	7 (36.8)			
pDU-n (%)	0	6 (46.2)	9 (47.4)	5 (26.3)	0.246	0.946	0.179
（十二指腸浸潤）	1	7 (53.8)	10 (52.6)	14 (73.7)			
pS-n (%)	0	6 (46.2)	11 (57.9)	3 (15.8)	0.061	0.513	0.007
（膵前方組織への浸潤）	1	7 (53.8)	8 (42.1)	16 (84.2)			
pPV-n (%)	0	10 (76.9)	15 (78.9)	14 (73.7)	0.835	0.892	0.703
（門脈系への浸潤）	1	3 (23.1)	4 (21.1)	5 (26.3)			

R, pDU, pS, pPV：0（なし）、1（あり）

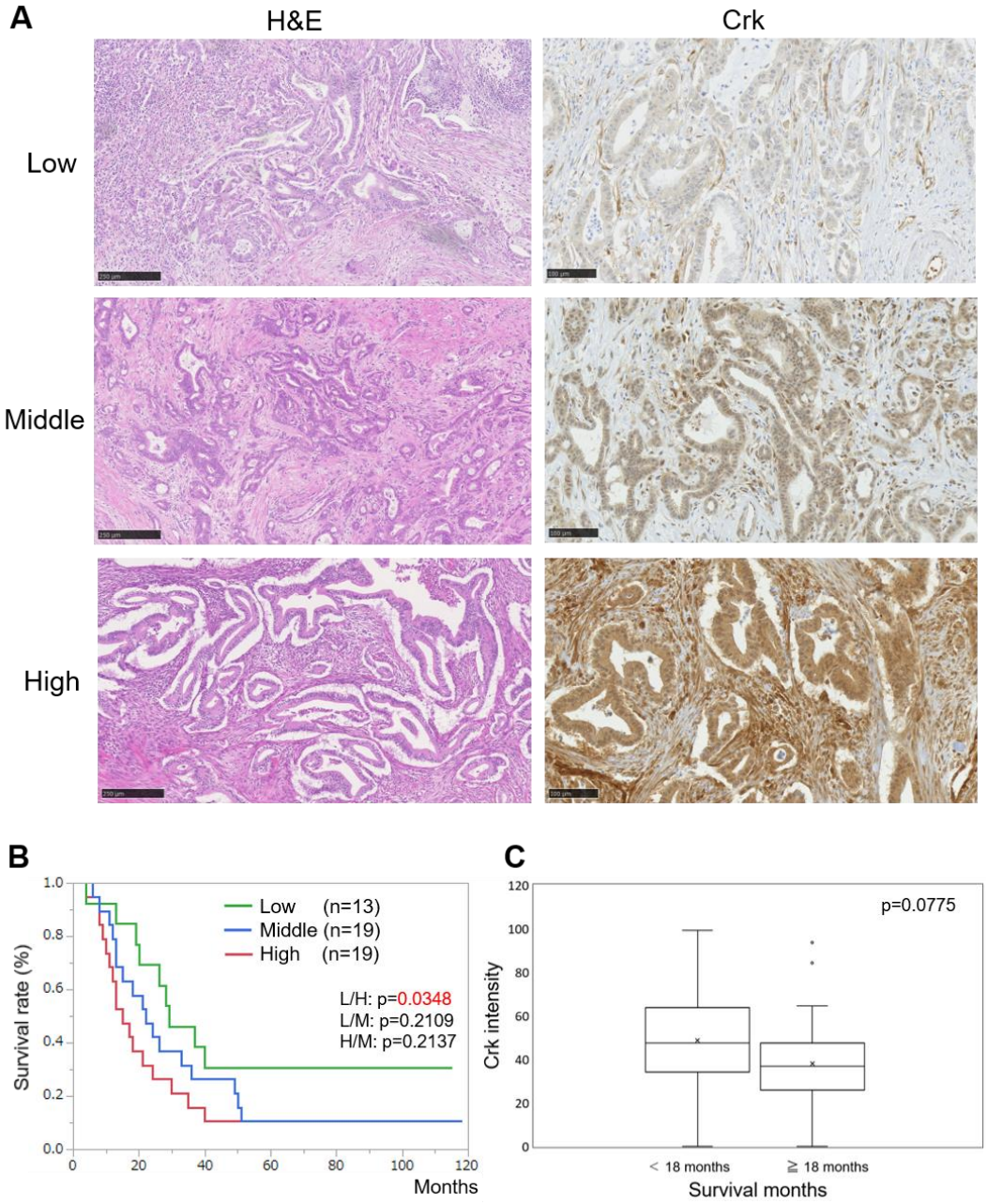


図 5　ヒト PDAC 組織における Crk の発現量と予後との関連

(A) ヒト PDAC 手術検体の H&E 染色および Crk 免疫組織化学染色。Crk の発現量を low、middle、high の 3 群に分類した。Scale bar = 250 µm（H&E）, 100 µm（Crk）

(B) PDAC 患者 51 人の全生存期間の Kaplan-Meier 分析。Crk の発現レベルは low（緑）、middle（青）、high（赤）で示されている。

(C) Crk 発現量と PDAC 患者の予後との関係。患者の予後が 18 ヶ月以上の群と 18 ヶ月未満の群に分類して比較した。

2) Crk および関連タンパク質の発現解析

次に 4 種類の PDAC 細胞株（PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2、Capan-2）を使用し、Crk およびその関連タンパク質の発現をウエスタンブロッティング法で、Crk と下流分子との結合を免疫沈降法で検討した。細胞株間において Crk、Crk-L、p130^{Cas}、paxillin、Dock180 の発現量に有意差は認められなかったが、C3G の発現量は PANC-1 および MIA PaCa-2 細胞で増加を認めた（図 6 A)。免疫沈降法では、Dock180 は Crk と Crk-L の両方に結合したが、C3G は Crk よりも Crk-L に対する結合能力が高かった（図 6 B)。

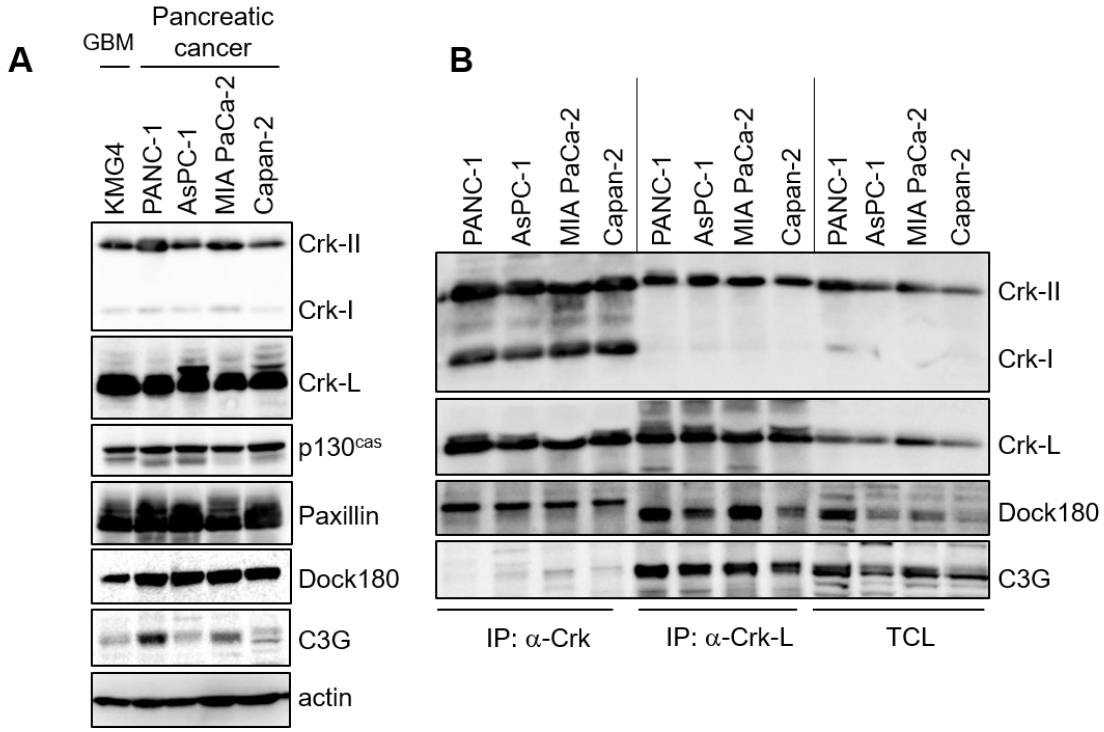


図 6　PDAC 細胞株における Crk および関連タンパク質の発現解析

(A) ウエスタンブロッティング法により、4 種類の PDAC 細胞株間で Crk およびその関連タンパク質の発現量を比較した。神経膠芽腫細胞株 KMG4 は比較対照として使用された。

(B) 免疫沈降法で Crk および CrkL と Dock180 あるいは C3G の結合量を解析した。TCL：total cell lysate。

3) Crk ノックダウン PDAC 細胞の樹立

PDAC の悪性化における Crk の役割を調べるために、shRNA により 4 種類のヒト PDAC 細胞株で Crk-I/II の安定ノックダウンを行い、Crk-I と Crk-II 共に発現が減少した PANC-1、AsPC-1 、MIA PaCa-2 細胞を 2 クローンずつ樹立した。Capan-2 細胞は極めて強固な細胞間接着を示しトランスフェクション効率が低く、複数回試みたものの Crk ノックダウン細胞を樹立することは困難であった。また PANC-1 細胞においては Crk-II のノックダウン効率はやや低かった(図 7 A)。Crk ノックダウンにより PDAC 細胞は、細胞輝度の低下と平坦な形態への変化が認められ、また細胞質の伸展が低く細胞は球状の形態変化を示した（図 7 B)。

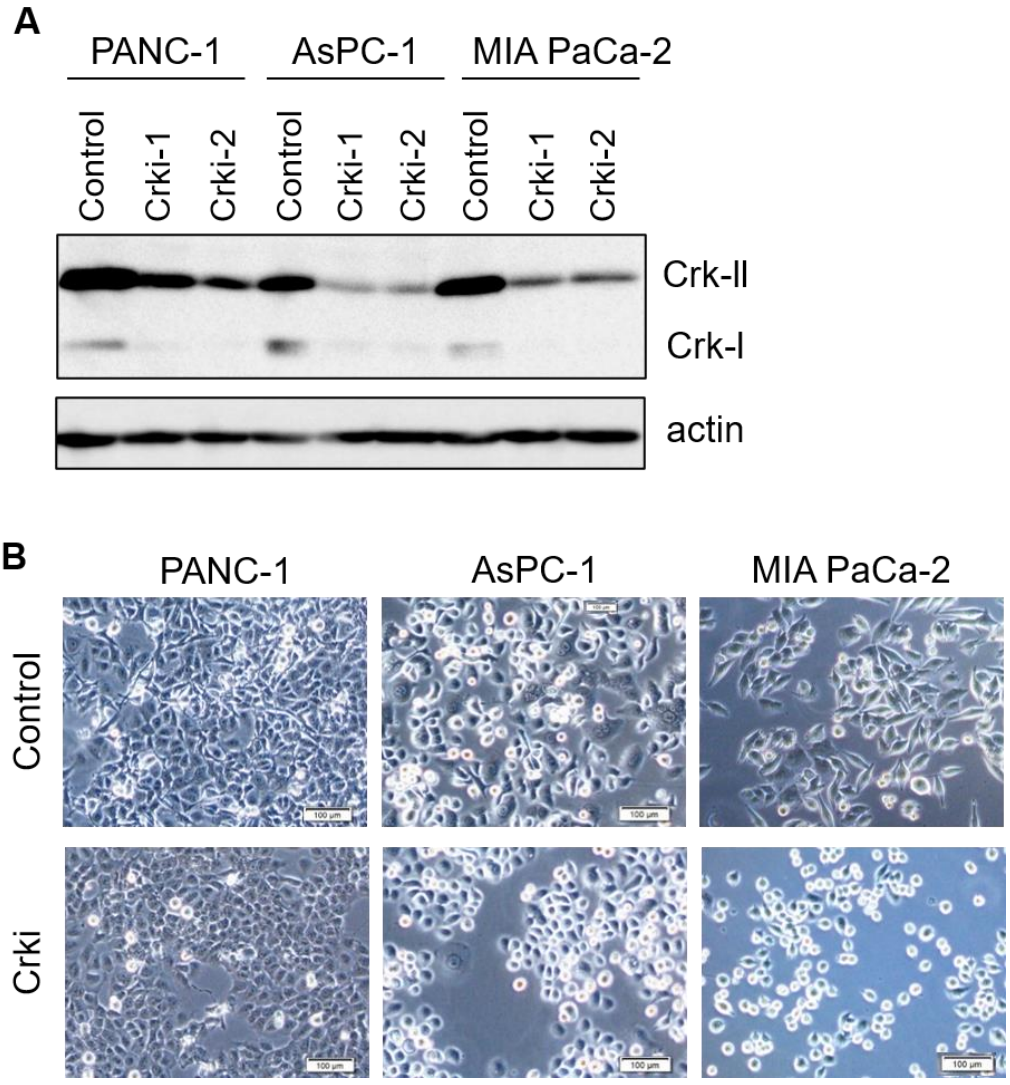


図 7　Crk ノックダウン PDAC 細胞の樹立と形態変化

(A) PANC-1、AsPC-1、および MIA PaCa-2 細胞に対し、Crk を標的とする shRNA を産生するプラスミドを安定的にトランスフェクション後、ウエスタンブロッティング法により Crk ノックダウン効率を確認した（Crki)。また空ベクターを導入したコントロール細胞（control）も樹立した。アクチンのブロットはローディングコントロールとして使用した。
(B) 位相差顕微鏡によりコントロール細胞（control)、Crk ノックダウン細胞（Crki）の形態を観察した。

4) Crk ノックダウン細胞の表現型の解析

樹立した Crk ノックダウン細胞を使用して表現型の解析を行った。まず細胞数を計測することにより細胞の足場依存性増殖能を調べたところ、Crk ノックダウン細胞はコントロール細胞と比較して増殖率が有意に低下し、特に AsPC-1 および MIA PaCa-2 細胞において顕著であった（図 8 A)。続いて Crk ノックダウン細胞の足場非依存性細胞増殖能を Colony formation assay により分析した。PANC-1 および AsPC-1 細胞の Crk ノックダウン細胞では大型コロニーの形成が抑制された（図 8 B)。Wound healing assay では、PANC-1 細胞で Crk ノックダウンにより細胞運動性が有意に低下した（図 8 C)。一方、AsPC-1 細胞と MIA PaCa-2 細胞は細胞間接着が弱く、培養ディッシュ上で 100% confluent にならないため本実験系での評価はできなかった。Adhesion assay により細胞外基質への接着性の測定を行ったところ、Crk をノックダウンした PANC-1 細胞ではフィブロネクチンに対する接着能が低下し、一方 AsPC-1 細胞ではコラーゲンに対する接着能が低下した（図 8 D)。以上より、Crk ノックダウン PDAC 細胞において細胞の増殖能、運動能、接着能が低下することが明らかとなった。

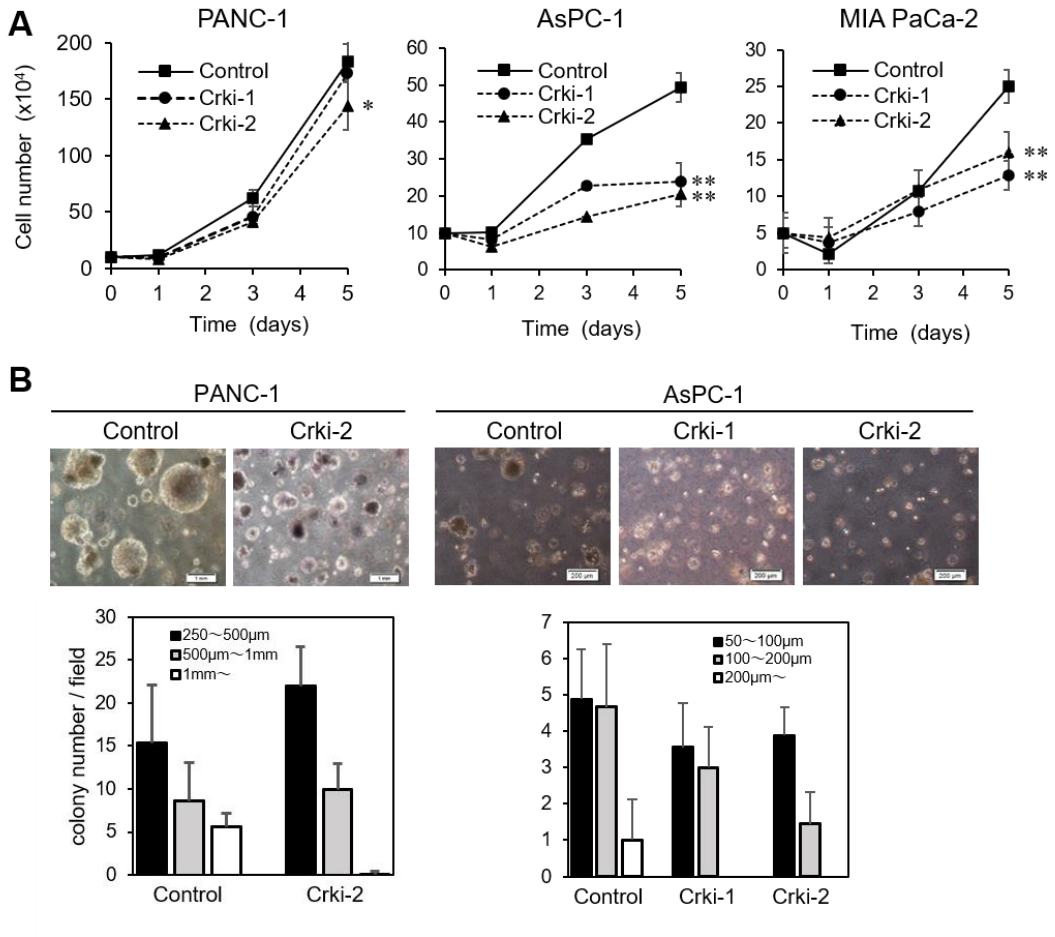


図 8　Crk ノックダウン PDAC 細胞の増殖・運動・接着能の解析

(A) Crk ノックダウン細胞の足場依存性細胞増殖能の解析。細胞を培養ディッシュ上に播種後、1、3、5 日目に細胞数を計測した。グラフは 3 回の独立した実験での平均±標準偏差を示す。* $P < 0.05$、** $P < 0.01$。

(B) Colony formation assay による足場非依存性細胞増殖の評価。細胞を軟寒天培地に播種し、1 週間（PANC-1）または 2 週間（AsPC-1）培養後、コロニー数を大きさ別に計測した。

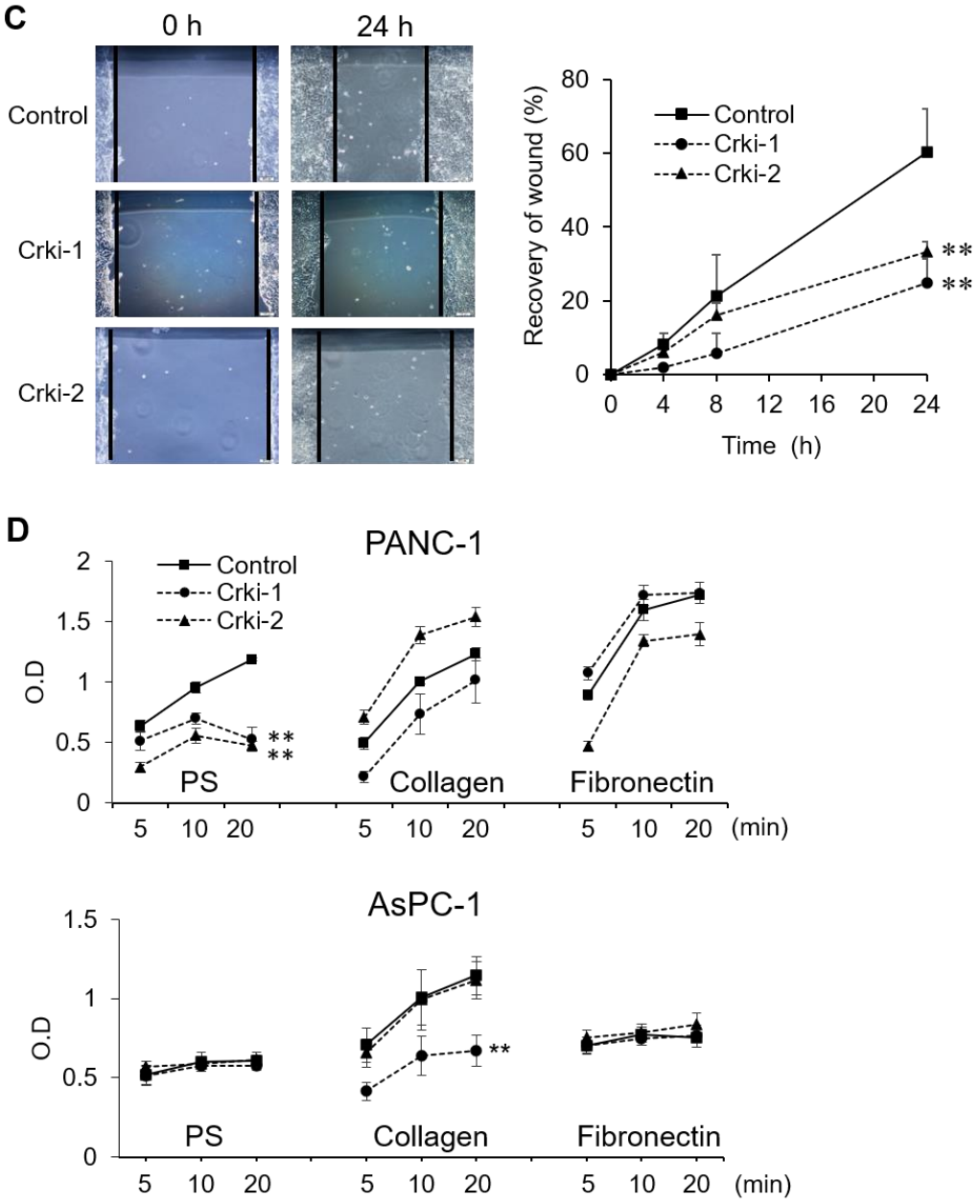


図 8

(C) Wound healing assay による細胞運動性の評価。PANC-1 細胞の移動距離は創傷後 4、8、24 時間後に測定し、傷の回復率（%）として評価した。グラフは 3 回の独立した実験の平均±標準偏差を示す。** $P < 0.01$。

(D) Adhesion assay による接着能の評価。細胞をコラーゲンまたはフィブロネクチンでコーティングした培養プレート上に播種した。コントロールとしてポリスチレン（PS）ディッシュを用いた。5、10、20 分培養後、各ウェルに接着した細胞を 0.04%クリスタルバイオレットで染色後に溶解し、OD A590 nm の分光光度計で定量した。** $P < 0.01$。

5) FAK 阻害剤によるリン酸化の変化の評価

PDAC 細胞の分子標的治療において Crk ノックダウンと相加あるいは相乗作用がある分子を探索するために、Crk シグナル経路の関連分子である接着斑キナーゼ FAK に着目した。Crk-II は $p130^{Cas}$ と複合体を形成することにより FAK のキナーゼ活性を調節しており、Crk ノックダウンによりインテグリンを介した FAK の自己リン酸化が低下すると報告されている（Iwahara et al., 2004）。また FAK 阻害剤である Defactinib と抗 PD1 抗体である Pembrolizumab および Gemcitabine の併用療法は、膵癌を含む固形癌患者に対する第 1 相試験で良好な忍容性を示した（Wang-Gillam et al., 2018）。そこで、PDAC 細胞における FAK 阻害剤添加によるリン酸化の変化を評価した。PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2 細胞において FAK 阻害剤 PF 573228 を添加すると濃度依存性に細胞の増殖能が低下したが（図 9 A）、FAK のリン酸化は PANC-1 細胞で濃度依存性に低下したもののAsPC-1、MIA PaCa-2 細胞では明らかな変化は認めなかった（図 9 B）。

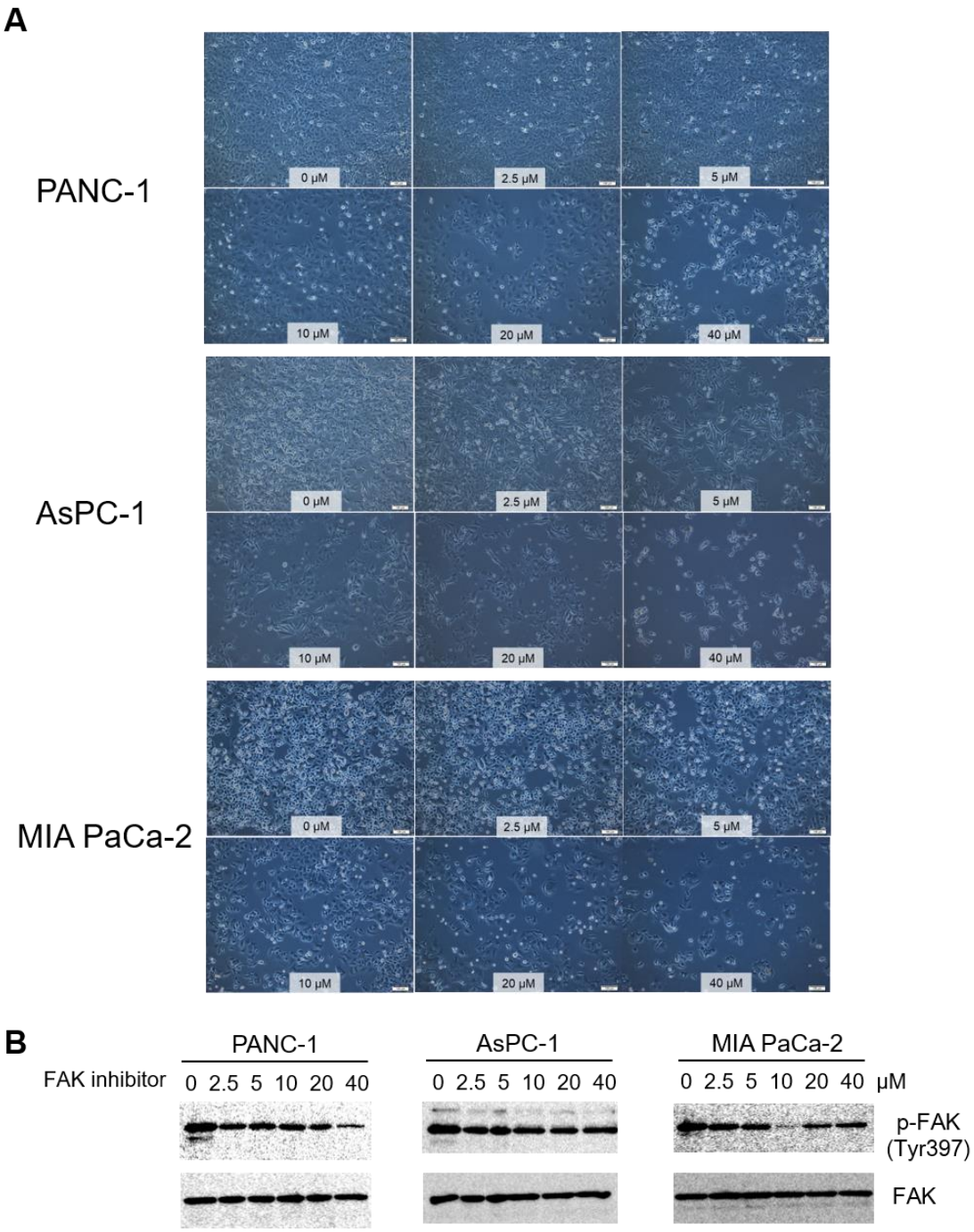


図 9　FAK 阻害剤添加時の FAK のリン酸化の変化

(A) 細胞に FAK 阻害剤 PF 573228 を 0、2.5、5、10、20、40 μM の濃度で添加し、48 時間後の細胞形態を位相差顕微鏡で確認した。

(B) FAK の発現量（下）とリン酸化量（上）をウエスタンブロッティング法により確認した。

6) 増殖関連タンパク質のリン酸化の評価

図 9 B の結果より、FAK 阻害剤による FAK リン酸化の低下が明らかではなかったため、次に血清刺激条件下で他の増殖関連タンパク質のリン酸化状態を評価した。c-Met は、シグナル伝達経路において Crk の上流に位置しているにも関わらず、PANC-1 および AsPC-1 細胞において Crk ノックダウンにより抑制される傾向が認められた。EGFR、FAK、AKT、p38MAPK、および ERK のリン酸化レベルは有意な変化を認めなかった（図 10）。従って、Crk は c-Met のリン酸化レベルを制御し PDAC の悪性化に関与している可能性が示唆された。

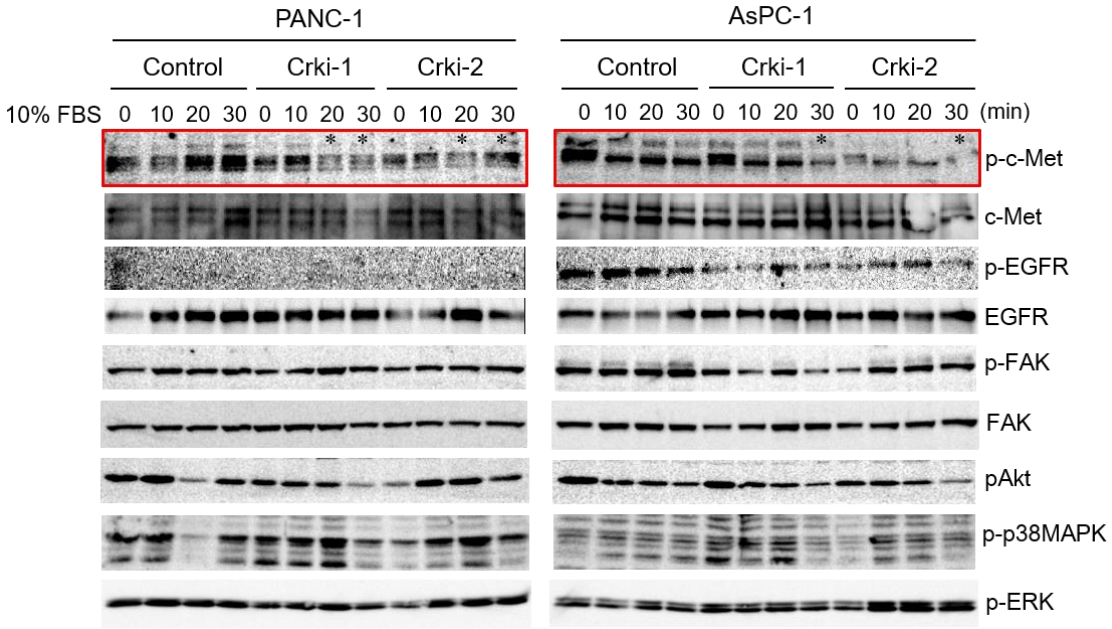


図 10　Crk ノックダウンによる増殖関連タンパク質のリン酸化の変化

細胞を一晩血清飢餓状態にした後、10%FBS で 0、10、20、30 分刺激後に細胞を回収し、それぞれのタンパク質のリン酸化の程度を比較した。

*：Crk ノックダウン細胞におけるリン酸化レベルの抑制。

7) c-Met 阻害剤（SU11274）添加時の増殖能の解析

PDAC 細胞に c-Met 阻害剤を添加した際の Crk ノックダウン細胞とコントロール細胞の増殖率の差異を検討するために MTT assay を行った。3 種類の PDAC 細胞において Crk ノックダウン細胞はコントロール細胞と比較して濃度依存性に細胞増殖が低下し、c-Met 阻害剤の効果が増強する傾向が認められた（図 11 A）。次に PANC-1 細胞を用いて細胞増殖能を検討した

所、通常培養液と比較して c-Met 阻害剤含有培養液で培養した場合、細胞増殖能が低下した。特に Crk ノックダウン細胞では c-Met 阻害剤により細胞増殖能がより低下した（図 11 B）。

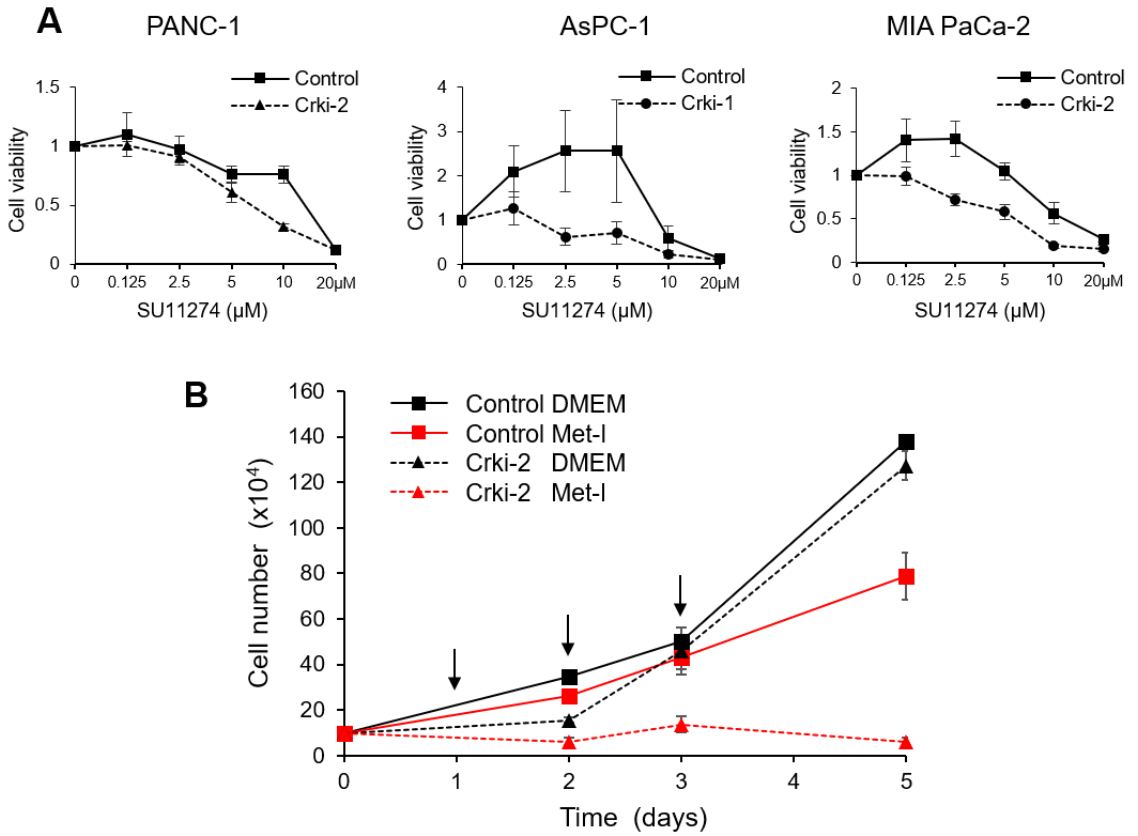


図 11　c-Met 阻害剤添加時の増殖能

(A) 3 種類の PDAC 細胞に c-Met inhibitor（SU11274）を各濃度で添加し MTT assay を行い吸光度を測定した。

(B) PANC-1 のコントロール細胞と Crk ノックダウン細胞を 1% FBS 含有 DMEM にて培養し、DMEM または SU11274（2 μM）を添加し、2、3、5 日目に細胞数を計測した。↓：矢印は SU11274 を添加した日を示す。

8) 癌幹細胞（Stemness marker）の発現解析

c-Met は膵癌の癌幹細胞マーカーの一つとされており（Li et al., 2007）、膵癌における c-Met と Crk の関連をさらに調べる上で幹細胞性に着目した。低接着（ultra low）ディッシュに 3 種類の PDAC 細胞を播種し stem cell medium で培養したところ、全ての細胞株で凝集塊を形成し、PANC-1 細胞では球状のスフィアを形成した（図 12 A）。mRNA を回収し膵癌の癌幹細胞マーカーと報告されている *CD44*、*CD133*、*c-Met*、および癌種を超えて

普遍的な幹細胞マーカーである *Sox2*、*Oct3/4*、*Nanog* の発現量を解析した。いずれのマーカーにおいても Crk ノックダウンによる発現亢進や低下に関して一定の傾向は認められなかった（図 12 B)。

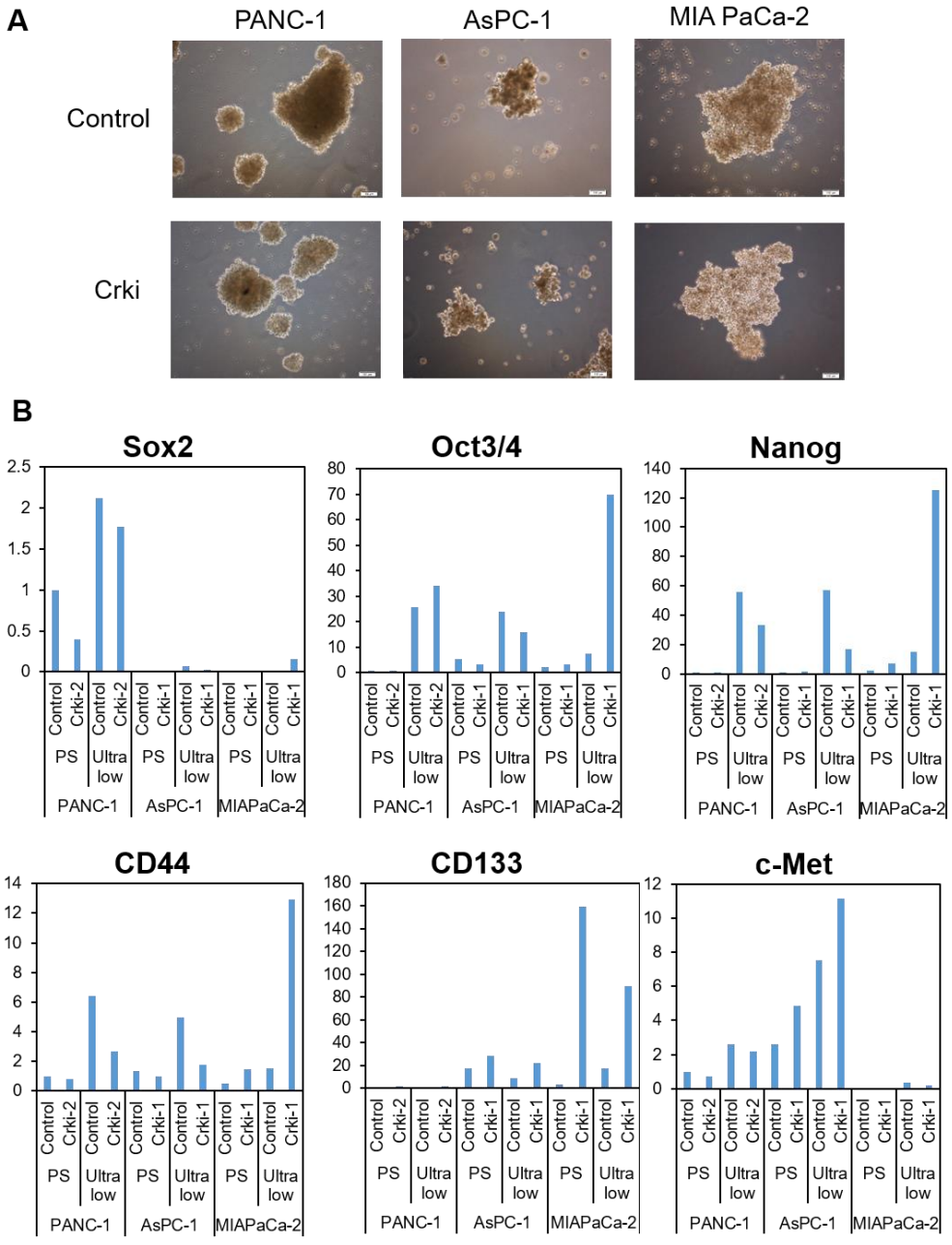


図 12　PDAC 細胞における stemness marker の発現

（A）Ultra low ディッシュ上で 3 種類の PDAC 細胞を stem cell medium を用いて培養し、14 日後の細胞形態を位相差顕微鏡で撮影した。

（B）PS ディッシュおよび ultra low ディッシュ上で培養した PDAC 細胞における幹細胞マーカーの mRNA の発現量を RT-PCR 法によって解析した。

9) リン酸化抗体アレイによる網羅的解析

次に PDAC 細胞において c-Met のリン酸化以外に Crk と関連する分子を探索することとし、多数の受容体型チロシンキナーゼのリン酸化状態を解析するためにリン酸化抗体アレイを行った。Positive control のリン酸化量で補正をかけた後、Crk ノックダウン細胞ではコントロール細胞に対して、EphB2 は 0.28 倍、ErbB4 は 0.23 倍、RET は 0.30 倍にリン酸化量が低下した。したがって、Crk はこれらの分子が関連するシグナル伝達経路も制御している可能性が示唆された（図 13）。

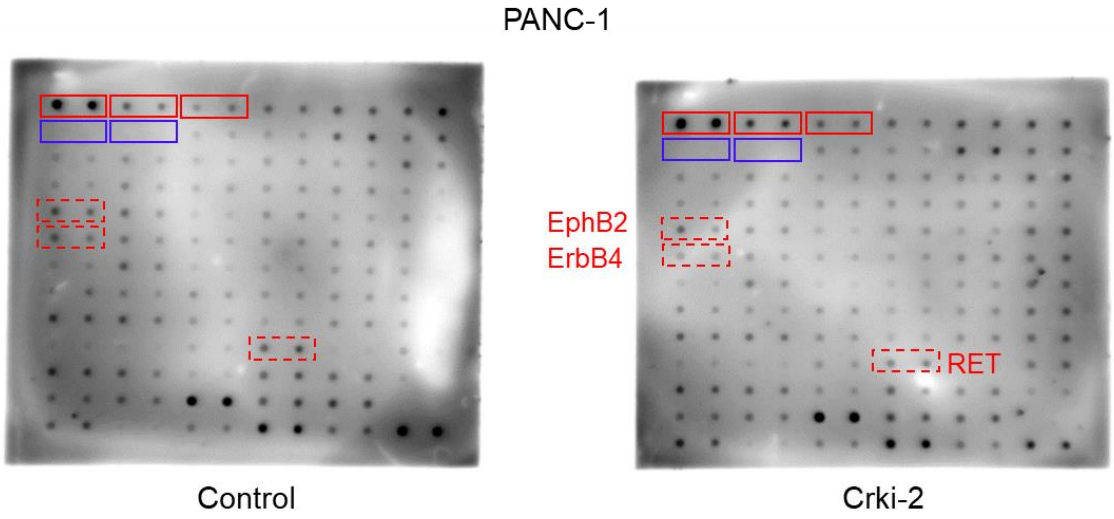


図 13　リン酸化抗体アレイ

PANC-1 のコントロール細胞と Crk ノックダウン細胞において、受容体型チロシンキナーゼのリン酸化状態を比較した。Crk ノックダウンによりリン酸化量が減少した分子を赤枠（点線）で囲っている。赤枠（実線）は positive control、青枠は negative control を示す。

10) tdTomato-luc2 導入 PDAC 細胞の樹立の検討

Crk ノックダウンにより *in vitro* において PDAC 細胞の増殖能、運動能、接着能が低下することが示されたため、次にマウス同所性異種移植モデルを用いて *in vivo* マウスでの腫瘍形成における Crk の役割を検討することとした。*In vivo* イメージングシステム（IVIS Spectrum）において、導入細胞の腫瘍増殖過程を可視化することを目的として tdTomato-luc2 の安定発現 PDAC 細胞の樹立を試みた。しかし PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2 細胞のいずれもトランスフェクション効率が低く、また導入できても Crk ノックダウン細胞においてノックダウン効率が低下してしまい、実験に使用可能なルシフェラーゼ活性を有した細胞を樹立することはできなかった（図 14）。

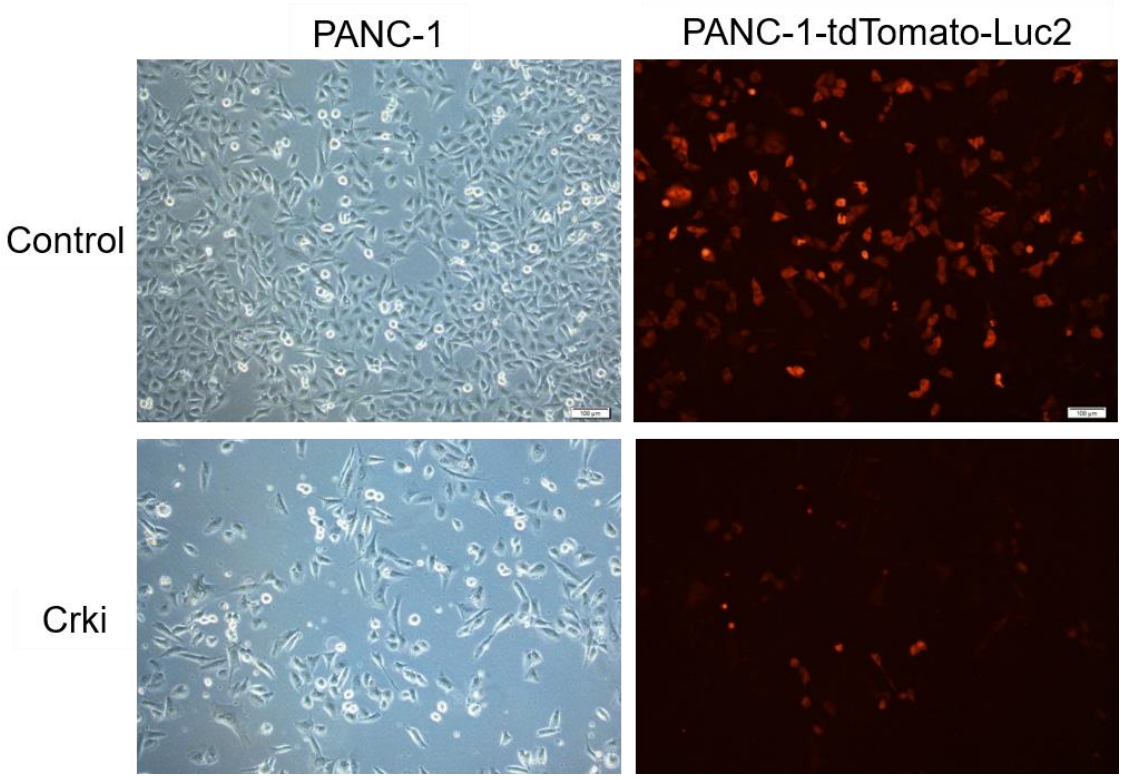


図 14　tdTomato-luc2 導入 PANC-1 細胞

tdTomato-luc2 導入 PANC-1 コントロール細胞および Crk ノックダウン細胞の赤色蛍光を観察した。

11）同所性異種移植モデルを用いた検討

上記のように tdTomato-luc2 安定発現 PANC-1 細胞の樹立は困難であったことから、*in vivo* マウスにおいて形成された腫瘍の大きさは肉眼で評価することとし、同所性異種移植モデルの作製を行った。5×10^5 個の PANC-1 細胞（コントロールおよび Crk ノックダウン）を 6 週齢の雌のヌードマウスの膵臓に被膜下注射した（各 n = 5）。コントロール群と Crk ノックダウン群の両方で膵臓に腫瘍が形成され、組織学的には低分化腫瘍細胞の増殖を認めた（図 15 A）。マウスの生存率を比較すると、Crk ノックダウン群では生存期間が有意に延長した（図 15 B）。腫瘍の大きさは Crk ノックダウン群で小さい傾向が見られたが、有意差は認めなかった（図 15 C）。形成された腫瘍において、急速な細胞増殖の結果として生じる壊死領域はコントロール群で広範囲であり、Crk ノックダウン群では有意に減少した（図 15 D）。また MIB-1 インデックスも Crk ノックダウン群で有意に低値を示した（図 15 E）。以上より、*in vivo* マウスにおいても Crk ノックダウンにより腫瘍の悪性度が低下することが示された。

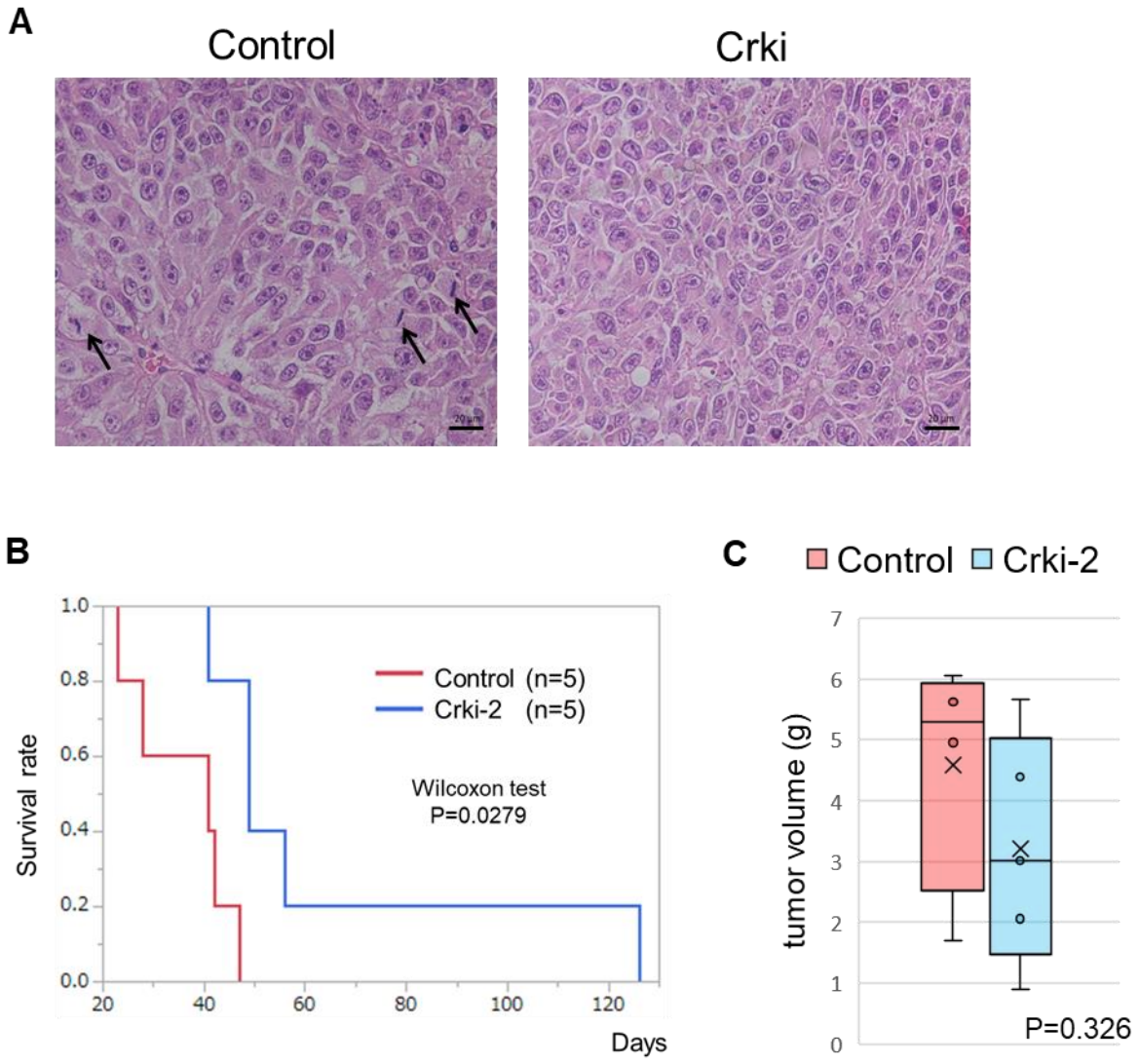


図 15　同所性異種移植モデルマウスにおける腫瘍形成と生存率
(A) 5×10^5 個の PANC-1 細胞(コントロールおよび Crk ノックダウン細胞)を 6 週齢の雌ヌードマウスの膵臓に被膜下注射して形成された腫瘍の H&E 染色。矢印は分裂期の細胞を示す。
(B) マウス各群における全生存率を示すカプラン・マイヤー曲線。
(C) 腫瘍の大きさの比較。

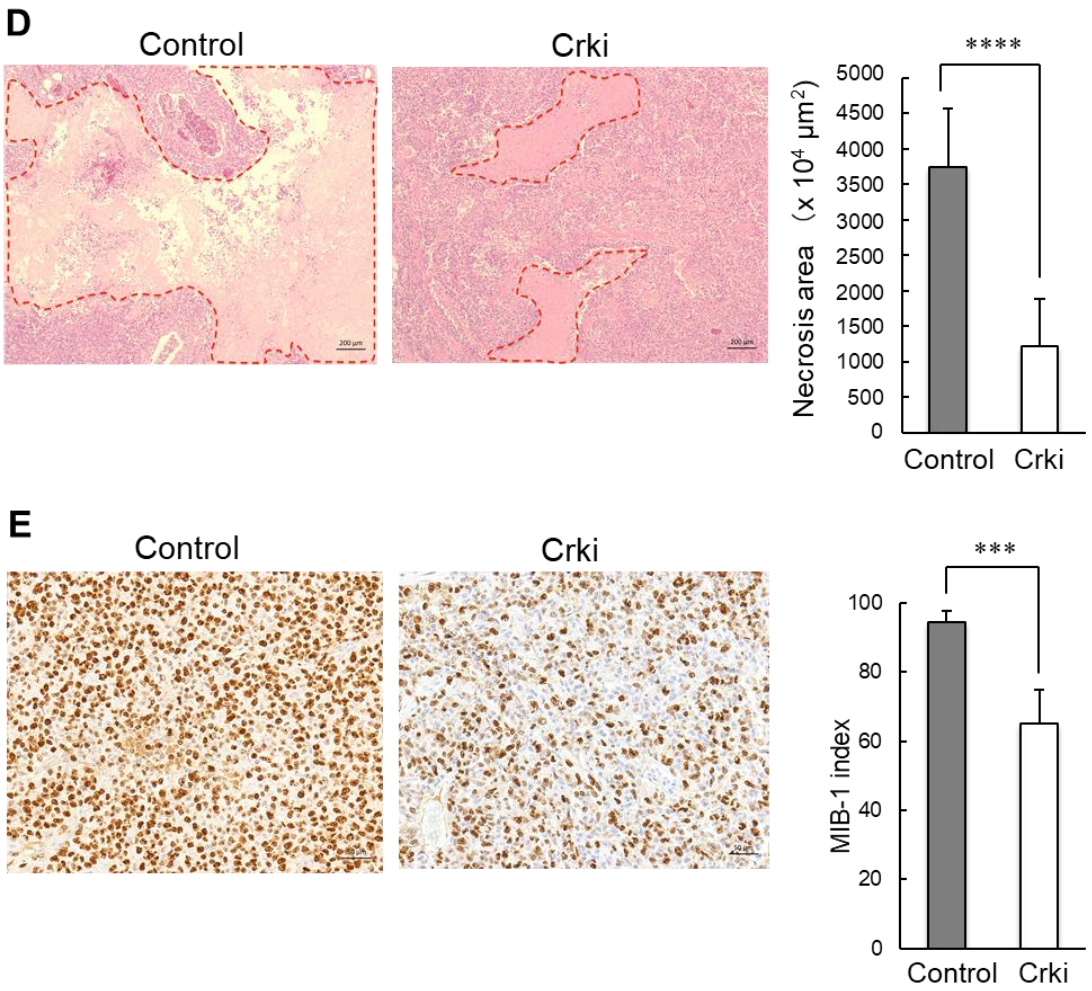


図 15

(D, E) 形成された腫瘍において、壊死領域（D）および MIB-1 インデックス（E）を測定し、平均±標準偏差としてグラフに示した。測定には、各群で壊死領域の大きいものから 5 領域（D）および MIB-1 インデックスが低いものから 6 領域（E）が選択された。*** $P < 0.001$、**** $P < 0.0005$。

【考察】

これまで、北海道大学腫瘍病理学教室の先行研究により、アダプター分子 Crk は様々な癌種において過剰発現しており、Crk ノックダウンにより癌細胞の増殖能、運動能、接着能などが低下し、癌の悪性化に関与することが明らかになっている。本研究ではまず、膵癌の代表的な組織型である PDAC の外科切除検体 51 例を用いて免疫組織化学染色を行い、Crk 高発現群で生命予後が有意に不良であることを明らかにした。次に、3 種類の PDAC 細胞株を用いて Crk ノックダウン細胞を樹立し、*in vitro* 解析において c-Met のリン酸化抑制と細胞の増殖・運動・接着能が低下することを解明した。最後に *in vivo* 解析において、同所性異種移植モデルマウスの生存期間が Crk ノックダウンにより延長することを明らかにした。

膵癌の悪性化における Crk の役割についてこれまで報告はほとんど無く、本研究により他の癌種と同様に Crk は PDAC の悪性化に関わることが明らかとなった。本研究において Crk 高発現膵癌患者は低発現患者と比較して予後不良であったが（図 5)、肺癌細胞を用いた先行研究により、Crk の転写活性は EGF、PDGFA、TGF-β1 などの増殖因子や IL-2 などのサイトカイン刺激によって亢進することが明らかとなっており（Elmansuri et al., 2016)、膵癌細胞においてもそれらの関与が示唆される。また、*KRAS* や *Crk* を標的とする miR-126 の発現が PDAC 患者サンプルや細胞株で減少していることが報告されており（Frampton et al., 2012)、Crk や KRAS の発現量を亢進させる一因であると示唆される。一方、膵癌の分子標的治療の大きな制約となっているのが KRAS 変異である。KRAS 阻害剤は長年にわたって開発が進められてきたが、KRAS 変異蛋白質は既知の薬剤結合部位が存在せず、構造上阻害剤の創薬が困難であった。近年、G12C 変異 KRAS 蛋白質中のシステインと共有結合することにより KRAS 活性を阻害する AMG510 が KRAS 阻害剤として初めてヒトを対象とする臨床試験に到達し、非小細胞肺癌患者に対する抗腫瘍効果が認められた（Canon et al., 2019)。KRAS 阻害剤の開発は今後さらなる発展が期待されるが、膵癌で多くみられる G12D や G12V の変異型に対する阻害剤の開発は途上である。Crk はアダプター蛋白質として RAS 以外の低分子量 G 蛋白質の活性化にも関与しており、Crk を標的とすることで RAS に依存しない経路の抑制による腫瘍の悪性度の低下が期待される。実際、PDAC 細胞において Crk や CrkL はグアニンヌクレオチド交換因子である Dock180 や C3G と結合していることから（図 6 B)、Crk/Dock180/Rac あるいは Crk/C3G/Rap1 経路が活性

化していると考えられる（Kobashigawa et al., 2007）。Dock180/Rac 経路は、細胞膜のラッフリング形成を促進し、運動・浸潤能を亢進させる。C3G/Rap1 経路は、細胞間あるいは細胞―基質間の接着を制御する。これらはいずれも PDAC の旺盛な細胞浸潤能に寄与すると示唆され、これらを俯瞰的に制御する Crk を治療標的とすることは効果的な戦略であると考えられる。

膵癌に対する分子標的治療薬で現在治療に適用されているのは、Gemcitabine との併用による Erlotinib のみである。MEK1/2 阻害剤、mTOR 阻害剤、各種 TRK 阻害剤などを使用した臨床試験も実施されたが、それらは第 3 相試験まで至らず、本研究でも Crk ノックダウンによる ERK、Akt、EGFR のリン酸化レベルに有意な変化は認めなかった。これまでに HGF/c-Met シグナルの活性化は細胞の浸潤・増殖能を促進し腫瘍形成に関与していると報告されている（Ebert et al., 1994）。また c-Met 阻害剤は膵癌を含む様々な癌で抗腫瘍効果があるとして現在注目されており（Ghanaatgar-Kasbi et al.,2018）、固形癌患者に対する経口 c-Met 阻害剤である Tivantinib と Gemcitabine を併用した第 1 相試験ではその安全性と耐用性が示された（Pant et al., 2014）。本研究では、PANC1-と AsPC-1 細胞において Crk ノックダウンにより Crk の上流に位置するにもかかわらず c-Met のリン酸化が抑制された。これまでに膀胱癌において、Crk はリガンドである HGF 依存的あるいは非依存的に c-Met を活性化することが明らかになっている。Crk は Zeb1、E-cadherin、N-cadherin、vimentin、MMP-2/-9 などの上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition, EMT）マーカーの発現変化を起こし EMT を誘導する。また HGF 発現を誘導して c-Met のリン酸化を引き起こし、HGF/c-Met/Crk ポジティブフィードバックループを介した c-Met シグナルの活性化をもたらす。また Crk は、p-Gab1/Crk 複合体を形成することにより、Gab1 の持続的なリン酸化に寄与し、c-Met シグナルの長期活性化をもたらす（Matsumoto et al., 2015; Watanabe et al., 2009b）。膵癌においても、HGF/c-Met/Crk シグナル経路において Crk が c-Met 蛋白質の安定化に寄与し、更に HGF 産生を制御している可能性が示唆された（図 16）。また膵癌の転移・浸潤に関して EMT の関与も重要とされており、c-Met シグナルとの関連に関してさらなる検討が必要である。さらに本研究で実施した RTK リン酸化抗体アレイで、EphB2、ErbB4、RET のリン酸化レベルが Crk ノックダウンによって減少したことから、PDAC において Crk はこれらが関与するシグナル伝達経路をも制御している可能性が示唆された。

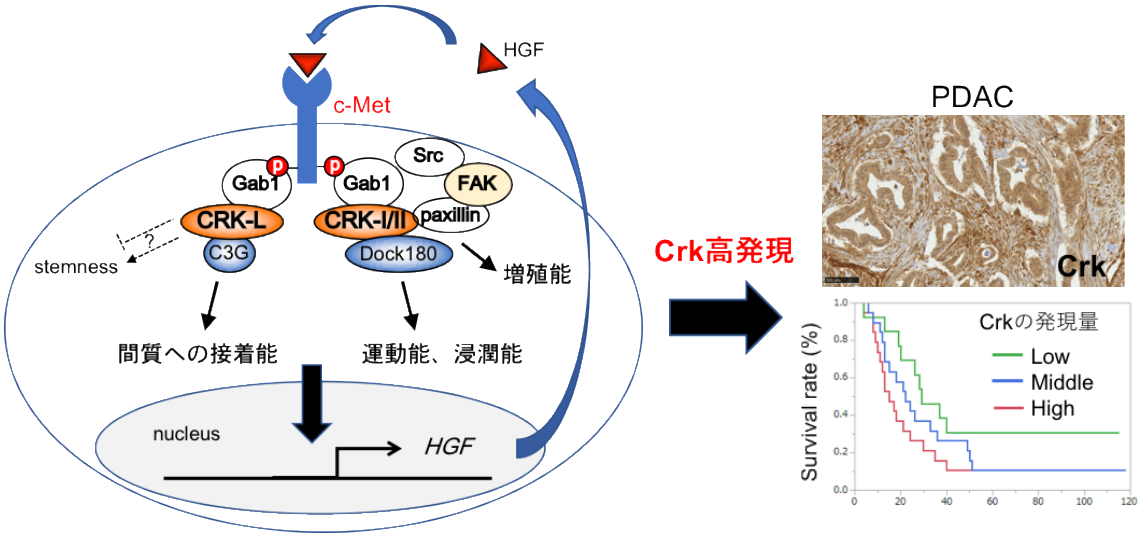


図 16　膵癌細胞における Crk 関連シグナルと予後との関連性
膵癌細胞において、Crk は c-Met のリン酸化を介して細胞増殖・接着・運動能を制御する。Crk を高発現している膵癌患者は予後不良である。（左図は一部先行論文の結果を含む）。

膵癌は豊富で密な線維性間質（desmoplasia）を特徴としており、膵癌細胞のシグナルによって膵星細胞（pancreatic stellate cell, PSC）が増殖して間質を増やし、PSC が膵癌細胞の増殖を促進する癌間質相互作用が膵癌悪性化の一因である（Bachem et al., 2005）。また desmoplasia が組織間隙圧を上昇させ抗癌剤耐性に関与しているとされており、膵癌において間質が癌組織のバリアーとして機能していることが示されている（Provenzano et al., 2012）。近年、KRAS 変異依存的 PDAC マウスモデルにおいて、FAK 阻害薬 VS-4718 は、間質の線維化を抑制することにより腫瘍組織内に CD8 陽性細胞障害性 T cell を浸潤させ、腫瘍増殖を抑制することが報告された（Jiang, et al., 2016）。一方で、膵癌の間質反応は血管新生を抑制して癌の増生を抑えるという報告　（Rhim, et al., 2014）や、Shh シグナル伝達を阻害する SMO 阻害剤である Vismodegib を Gemcitabine と投与し間質の増生を抑えても患者予後に有意差は認めないとの報告（Catenacci, et al., 2015）もあり、膵癌の間質反応の意義に関してはさらなる研究が必要とされる。本研究においては、FAK 阻害薬が PDAC 細胞の増殖能を低下させたため（図 9 A）、Crk と FAK の両分子を治療標的とすることで治療効果が認められる可能性も考えられる。Crk を癌の治療標的として考える上で、siRNA を腫瘍組織へ効率的に運搬するシステムの確立には、間質反応との関わりを検討する必

要がある。一方、sphere-forming ability assay により濃縮された膵癌幹細胞の一部では、Crk ノックダウンにより幹細胞マーカーの発現が上昇したことから（図 12 B)、柔らかい間質の環境下においては膵癌幹細胞が出現する可能性があり、更なる検討が必要である。

本研究の問題点として下記の 4 点が挙げられる。（1）本研究では、ドメイン構造の異なる CRK-Ⅰ、CRK-Ⅱ、CrkL を分離して検討していない。PDAC 細胞株では CrkII に加えて Crk-L の高発現が認められており（図 6 A）、特に C3G への結合能力は Crk-L で優位である（図 6 B）。この現象は他の癌種でも認められており、また Crk-L のノックダウン細胞の樹立は困難であることが多いことから、がん治療では Crk-L を治療標的とするのがより適切であるとの考えもある。このように、膵癌において Crk のどのフォームがより優位に悪性化能に関与しているのかを検証する必要がある。（2）本研究では Crk ノックダウン細胞を使用した検討のみを行っている。結果の検証のため、CRK 低発現細胞に Crk を人為的に過剰発現させた細胞を作製し、同様のシグナル伝達の変化が起こるのか検討することが望ましい。（3）Crk がどのように HGF/c-Met シグナルを制御するかについて、c-Met のリガンドである HGF の発現量を解析する必要がある。（4）本研究では膵癌の代表的な組織型として PDAC を用いたが、他の組織型においても同様の結果となるか検証が必要と考えられる。これらの検討を通じて、膵癌における Crk の機能がより詳細に解明されると期待される。

【結論】

1) 本研究から得られた新知見

① Crk ノックダウン PDAC 細胞において c-Met のリン酸化が減少し、同時に細胞の増殖能、運動能、接着能の低下を認めた。

② PDAC 細胞の Crk ノックダウンにより、同所性異種移植モデルマウスの生存期間の延長が示された。

③ ヒト膵癌切除検体において、Crk 低発現群は高発現群と比較し予後が良好であった。

2) 新知見の意義

現在膵癌の薬物療法は十分な治療効果を得られておらず、膵癌は他の癌種と比べ依然として極めて予後不良の癌である。本研究により得られた新知見により、Crk とその関連蛋白質は膵癌治療において新たな分子標的となることが期待される。

3) 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

Crk 特異的阻害剤を開発し、膵癌の悪性化指標における抑制効果を *in vitro*、および *in vivo* 解析で検証する。

4) 今後の課題

膵癌における Crk 関連のシグナル伝達系の詳細な解析、KRAS 変異との関連、Crk 阻害剤の開発においてはさらなる研究が必要である。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ平野聡教授に深謝致します。また、適切な助言と直接の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室、田中伸哉教授、津田真寿美准教授、王磊助教に感謝の意を表します。

最後に、本論文を作成するに当たってご指導･ご協力を頂いたすべての皆様に、重ねて御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Bachem, M.G., Schünemann, M., Ramadani, M., Siech, M., Beger, H., Buck, A., Zhou, S., Schmid-Kotsas, A., Adler, G. (2005). Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. Gastroenterology. *128*, 907-921.

Bos, J.L., Rehmann, H., Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins, Cell. *129*, 865–877.

Brown, M.C., Turner, C.E. (2004). Paxillin: adapting to change. Physiol. Rev. *84*, 1315-1339.

Cabodi, S., del Pilar Camacho-Leal, M., Di Stefano, P., Defilippi, P. (2010). Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. Nat. Rev. Cancer. *10*, 858-870.

Canon, J., Rex, K., Saiki, A.Y., Mohr, C., Cooke, K., Bagal, D., Gaida, K., Holt, T., Knutson, C.G., Koppada, N., et al. (2019). The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. Nature. *575*, 217-223.

Catenacci, D.V.T., Junttila, M.R., Karrison, T., Bahary, N., Horiba, M.N., Nattam, S.R., Marsh, R., Wallace. J., Kozloff, M., Rajdev, L., et al. (2015). Randomized phase Ib/II study of gemcitabine plus placebo or vismodegib, a hedgehog pathway inhibitor, in patients with metastatic pancreatic cancer. J. Clin. Oncol. *33*, 4284-4292.

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., et al. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. N. Engl. J. Med. *364*, 1817-1825.

Ebert, M., Yokoyama, M., Friess, H., Buchler, M.W., Korc, M. (1994). Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. Cancer Res. *54*, 5775-5778.

Elmansuri, A.Z., Tanino, M., Mahabir, R., Wang, L., Kimura, T., Nishihara, H., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Tsuda, M., Tanaka, S. (2016). Novel signaling collaboration between TGF-ß and adaptor protein Crk facilitates EMT in human lung cancer. Oncotarget. *7*, 27094-27107.

Fathers, K.E., Bell, E.S., Rajadurai, C.V., Cory, S., Zhao, H., Mourskaia, A., Zuo, D., Madore, J., Monast, A., Mes-Masson, A.M., et al. (2012). Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis. Breast Cancer Res. *14*, R74.

Feller, S.M., Lewitzky, M. (2006). Potential disease targets for drugs that disrupt protein–protein interactions of Grb2 and Crk family adaptors, Curr. Pharm. Des. *12*, 529-548.

Frampton, A.E., Krell, J., Jacob, J., Stebbing, J., Castellano, L., Jiao, L.R. (2012). Loss of miR-126 is crucial to pancreatic cancer progression. Expert Rev Anticancer Ther. *12*, 881-884.

Furukawa, T. (2008). Molecular targeting therapy for pancreatic cancer: current knowledge and perspectives from bench to bedside. J. Gastroenterol. *43*, 905-911.

Ghanaatgar-Kasbi, S., Khorrami, S., Avan, A., Aledvoud S.A., Fems, G.A. (2018). Targeting the c-MET/HGF signaling pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma. Curr. Pharm. Des. *24*, 4619-4625.

Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., Vande Woude, G. (2012). Targeting MET in cancer: rationale and progress. Nat. Rev. Cancer. *12*, 89-103.

Hoeve, J.T., Morris, C., Heisterkamp, N., Groffen, J. (1993). Isolation and chromosomal localization of CRKL, a human crk-like gene. Oncogene *8*, 2469-2474.

Iwahara, T., Akagi, T., Fujitsuka, Y., Hanafusa, H. (2004). CrkII regulates focal adhesion kinase activation by making a complex with Crk-associated substrate, p130Cas. Cell Biology. *101*, 17693-17698.

Jiang, H., Hegde, S., Knolhoff, B.L., Zhu, Y., Herndon, J.M., Meyer, M.A., Nywening, T.M., Hawkins, W.G., Shapiro, I.M., Weaver, D.T., et al. (2016). Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. Nat Med. *22*, 851-860.

Kobashigawa, Y., Sakai, M., Naito, M., Yokochi, M., Kumeta, H., Makino, Y., Ogura, K., Tanaka, S., Inagaki, F. (2007). Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK. Nat. Struct. Mol. Biol. *14*, 503-510.

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res. *67*, 1030-1037.

Linghu, H., Tsuda, M., Makino, Y., Sakai, M., Watanabe, T., Ichihara, S., Sawa, H., Nagashima, K., Mochizuki, N., Tanaka, S. (2006). Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS. Oncogene. *25*, 3547-3556.

Matsuda, M., Tanaka, S., Nagata, S., Kojima, A., Kurata, T., Shibuya, M. (1992). Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. Mol. Cell. Biol. *12*, 3482-3489.

Matsumoto, R., Tsuda, M., Wang, L., Maishi, N., Abe, T., Kimura, T., Tanino, M., Nishihara, H., Hida, K., Ohba, Y., et al. (2015). Adaptor protein CRK induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis

of bladder cancer cells through HGF/c-Met feedback loop. Cancer Sci. *106*, 709-717.

Mayer, B.J., Hamaguchi, M., Hanafusa, H. (1988). A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. Nature. *332*, 272-275.

Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H.J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., et al. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J. Clin. Oncol. *25*, 1960-1966.

Nishihara, H., Tanaka, S., Tsuda, M., Oikawa, S., Maeda, M., Shimizu, M., Shinomiya, H., Tanigami, A., Sawa, H., Nagashima, K. (2002). Molecular and immunohistochemical analysis of signaling adaptor protein Crk in human cancers. Cancer Lett. *180*, 55-61.

Pant, S., Saleh, M., Bendell, J., Infante, J.R., Jones, S., Kurkjian, C.D., Moore, K.M., Kazakin, J., Abbadessa, G., Wang, Y., et al. (2014). A phase I dose escalation study of oral c-MET inhibitor tivantinib (ARQ 197) in combination with gemcitabine in patients with solid tumors. Ann. Oncology. *25*, 1416-1421.

Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., Von Hoff, D.D., Hingorani, S.R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Cell. *21*, 418-429.

Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., Matrisian, L.M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. Cancer Res. *74*, 2913-2921.

Rhim, A.D., Oberstein, P.E., Thomas, D.H., Mirek, E.T., Palermo, C.F., Sastra, S.A., Dekleva, E.N., Saunders, T., Becerra, C.P., Tattersall, I.W.,

et al. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Cell. *25*, 735-747.

Sheahan, A.V., Biankin, A.V., Parish, C.R., Khachigian, L.M. (2018). Targeted therapies in the management of locally advanced and metastatic pancreatic cancer: a systematic review. Oncotarget. *9*, 21613-21627.

Tomizawa, M., Shinozaki, F., Motoyoshi, Y., Sugiyama, T., Yamamoto, S., Ishige., N. (2015). SU11274 suppresses proliferation and motility of pancreatic cancer cells. Oncol. Lett. *10*, 1468-1472.

Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., et al. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. N. Engl. J. Med. *369*, 1691-1703.

Wang-Gillam, A., Lockhart, A.C., Tan, B.R., Suresh, R., Lim, K.H., Ratner, L., Morton, A., Huffman, J., Marquez, S., Boice, N., et al. (2018). Phase I study of defactinib combined with pembrolizumab and gemcitabine in patients with advanced cancer. J. Clin. Oncol. No.380.

Wang, L., Tabu, K., Kimura, T. Tsuda, M., Linghu, H., Tanino, M., Kaneko, S., Nishihara, H., Tanaka, S. (2007). Signaling adaptor protein Crk is indispensable for malignant feature of glioblastoma cell line KMG4. Biochem. Biophys. Res. Commun. *362*, 976-981.

Warshaw, A.L., Fernandez-del Castillo, C. (1992). Pancreatic carcinoma. N. Engl. J. Med. *326*, 455-465.

Watanabe, T., Tsuda, M., Tanaka, S., Ohba, Y., Kawaguchi, H., Majima, T., Sawa, H., Minami, A. (2009a). Adaptor protein Crk induces Src-dependent activation of p38 MAPK in regulation of synovial sarcoma cell proliferation. Mol. Cancer Res. *7*, 1582-1592.

Watanabe, T., Tsuda, M., Makino, Y., Konstantinou, T., Nishihara1, H., Majima, T., Minami A., Feller, S.M., Tanaka, S. (2009b). Crk adaptor protein-induced phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration. Cell Res. *19*, 638-650.

Wiest, E.J., Smith, H.J., Hollingsworth, M.A. (2018). Met receptor inhibitor SU11274 localizes in the endoplasmic reticulum. Biochem. Biophys. Res. Commun. *501*, 858-862.

国立がん研究センターがん情報サービス．がん登録・統計（2019）
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html

島崎猛夫，石垣靖人，源利成，元雄良治.（2010）．膵癌治療への分子標的薬の応用．膵臓 *25,* 35-45.

田中伸哉,（2009）．シグナル伝達アダプター分子 CRK の生物学的役割．生化学 *81*, 361-376.